



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÕES MÍNIMAS BACTERICIDAS EM BIOFILMES DO
BIOCIDA CLORETO DE BENZALCÓNIO

SOFIA BUENAVENTURA CRESPO

CONSTITUIÇÃO DO JURI

Doutora Maria Manuela Castilho Monteiro de Oliveira

Doutora Marília Catarina Leal Fazeres Ferreira

Mestre Ana Rita Barroso Cunha de Sá Henriques

ORIENTADORA

Doutora Marília Catarina Leal
Fazeres Ferreira

2016

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÕES MÍNIMAS BACTERICIDAS EM BIOFILMES DO
BIOCIDA CLORETO DE BENZALCÓNIO

SOFIA BUENAVENTURA CRESPO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JURI

ORIENTADORA

Doutora Maria Manuela Castilho Monteiro de Oliveira

Doutora Marília Catarina Leal
Fazeres Ferreira

Doutora Marília Catarina Leal Fazeres Ferreira

Mestre Ana Rita Barroso Cunha de Sá Henriques

2016

LISBOA

Agradecimentos

-À Doutora Anabela Lança por todo o auxílio e conhecimento transmitidos ao longo do estágio

-À minha orientadora Professora Doutora Marília Ferreira, por me ter aceitado e por todo o apoio prestado, compreensão e disponibilidade durante a realização desta dissertação

- Ao Professor Doutor Fernando Bernardo, por todo o apoio e conhecimento transmitido, pela amizade, pela paciência infindável e ajuda prestada ao longo da realização do estágio, e pela disponibilidade na leitura da presente dissertação

-Aos meus pais, por terem proporcionado as condições que me permitiram a realização do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, e por todo o apoio emocional durante a concretização não só do curso como da presente dissertação

Determinação de concentrações mínimas bactericidas em biofilmes do biocida cloreto de benzalcónio

Resumo

Uma das formas de estudar a eficácia de um biocida é através da determinação da sua concentração mínima bactericida (CMB) em certas espécies bacterianas. Este procedimento é atualmente usado na determinação das suscetibilidades a antimicrobianos de bactérias potencialmente patogénicas em humanos e animais. Assim sendo, o presente trabalho experimental teve como objetivo estudar a eficácia do biocida cloreto de benzalcónio, através da determinação das suas CMB em cinco isolados bacterianos, quer na sua forma plasmática, quer em biofilme. Os resultados obtidos permitiram concluir que a eficácia do biocida além de depender do tipo de microrganismo presente e do tempo de contacto, também é alterada consoante os microrganismos estejam na sua forma plasmática ou em biofilme, sendo que o biocida é menos eficaz em biofilmes constituídos por mais do que uma espécie bacteriana. Concluiu-se que o isolado de *Pseudomonas aeruginosa* foi o responsável pela resistência demonstrada pelos outros isolados. Verificou-se também que o procedimento experimental adotado foi adequado para o estudo de eficácia do cloreto de benzalcónio, dado que foram determinadas as suas CMB, apresentando no entanto algumas limitações relacionadas com algumas metodologias adotadas. Ainda não existem muitos estudos que avaliem a eficácia de biocidas através da determinação de CMB em biofilmes constituídos por várias espécies microbianas. Por outro lado, a natureza variada dos biofilmes traduz-se numa dificuldade em prever os resultados da sua interação com biocidas. Assim sendo, justifica-se o desenvolvimento de protocolos que permitam fazer estudos de eficácia de biocidas em biofilmes multiespécie, de modo a aprofundar os conhecimentos nesta área.

Palavras-chave: biocidas, biofilmes, cloreto de benzalcónio, concentrações mínimas bactericidas, estudos de eficácia

Determination of minimum bactericidal concentrations in biofilmes of the biocide benzalkonium chloride

Abstract

The determination of a biocide's minimum bactericidal concentration (MBC) in certain bacterial species is one possible way of assessing its efficacy. This procedure is currently widely used to determine certain human and animal pathogenic bacteria's susceptibilities to antimicrobial agents. Thus, the present experimental procedure aimed to study the efficacy of the biocide "benzalkonium chloride", through the determination of its minimum bactericidal concentrations on the planktonic form and biofilms of five bacterial isolates. According to the results obtained, it was possible to conclude that the efficacy of the biocide not only depends on the type of microorganisms present and on the contact time, but it's also affected by the bacteria's spacial display, being less effective on multispecies biofilms. It was concluded that the *Pseudomonas aeruginosa* isolate was the main responsible for the resistance demonstrated by the other bacterial isolates to the biocide. It was also observed that the experimental procedure adopted was adequate to study the benzalkonium chloride's efficacy since it was possible to determine its MBC, despite presenting some limitations related to certain methodologies adopted. Currently, there aren't many studies that have evaluated a biocide's efficacy through the determination of its MBC in multispecies biofilms. On the other hand, the diverse nature of a biofilm makes it difficult to predict the outcome of its interactions with biocides. This justifies the need to develop protocols which will allow the evaluation of a biocide's efficacy in multispecies biofilms, thus improving the knowledge in this area.

Key words: biocides, biofilms, benzalkonium chloride, minimum bactericidal concentrations, efficacy studies.

Índice Geral

Agradecimentos.....	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
Índice Geral	v
Índice de Figuras	x
Índice de Tabelas	xi
Lista de abreviaturas.....	xii
Descrição das atividades desenvolvidas durante o estágio.....	1
Introdução.....	3
I. Revisão Bibliográfica	5
1. Biocidas	5
1.1 Breve história dos biocidas e da sua importância em Medicina Veterinária e na Sociedade.....	5
1.2 Biocidas e a sua definição.....	7
1.3 Critérios de seleção dos biocidas	8
1.4 A Avaliação de biocidas	9
1.4.1 Avaliação da eficácia	9
1.4.1.1 Desenvolvimento de metodologias de avaliação da eficácia dos biocidas.....	11
1.4.2 Fatores que alteram a eficácia dos biocidas.....	11
1.4.2.1 Número e localização dos microrganismos	11
1.4.2.2 Resistência Intrínseca dos microrganismos.....	12
1.4.2.3 Concentração e potência dos biocidas	12
1.4.2.4 Fatores físicos e químicos	13
1.4.2.5 Duração da exposição.....	13

1.4.3	Avaliação da segurança dos biocidas	14
1.5	A comercialização de biocidas	14
1.6	Mecanismos de ação dos biocidas.....	16
1.6.1	Reacções de oxidação.....	16
1.6.2	Reações cruzadas (“cross-linking”).....	16
1.6.3	Coagulação intracelular.....	17
1.7	Classificação química dos biocidas	17
1.7.1.1	Álcoois	17
1.7.1.2	Aldeídos	18
1.7.1.2.1	Formaldeído.....	18
1.7.1.2.2	Glutaraldeído	18
1.7.1.3	Biguanidas	18
1.7.1.3.1	Clorexidina.....	19
1.7.1.3.2	Alexidina	19
1.7.1.3.3	Biguanidas Poliméricas.....	19
1.7.1.4	Compostos à base de halogénios.....	20
1.7.1.4.1	Compostos à base de cloro	20
1.7.1.4.2	Compostos à base de iodo	20
1.7.1.5	Compostos de Prata.....	21
1.7.1.6	Peróxidos	21
1.7.1.6.1	Peróxido de Hidrogénio.....	21
1.7.1.6.2	Ácido Paracético.....	22
1.7.1.7	Fenóis	22
1.7.1.7.1	Halofenóis.....	22
1.7.1.7.2	Bisfenóis	22
1.7.1.8	Agentes de superfície (surfactantes)	23

1.7.1.8.1	Compostos de amónio quaternário	23
1.8	Mecanismos de resistência aos biocidas.....	24
1.8.1	Mecanismos de Resistência Intrínseca	25
1.8.1.1	Impermeabilidade da parede celular.....	25
1.8.1.2	Bombas de efluxo.....	27
1.8.1.3	Transformação enzimática de biocidas	28
1.8.2	Mecanismos de Resistência Adquiridos	28
2.	Biofilmes	30
2.1	A definição dos biofilmes.....	30
2.2	Influência dos biofilmes na eficácia de biocidas	31
2.3	Implicações da formação de biofilmes.....	32
2.4	Estratégias de prevenção, controlo e eliminação de biofilmes.....	33
2.4.1	Prevenção e controlo	34
2.4.2	Eliminação de biofilmes.....	34
2.4.2.1	Limpeza	34
2.4.2.2	Desinfecção	35
II-	Trabalho Experimental.....	36
1.	Objetivos	36
2.	Materiais e métodos	37
2.1	Seleção, purificação e isolamento das bactérias produtoras de biofilmes	37
2.2	Determinação da susceptibilidade a antibióticos dos isolados bacterianos selecionados.....	38
2.3	Estudo da eficácia do biocida cloreto de benzalcónio.....	39
2.3.1	Determinação da concentração mínima inibitória de cloreto de benzalcónio dos cinco isolados bacterianos em suspensão.....	39

2.3.2	Determinação da concentração mínima bactericida de cloreto de benzalcónio para os 5 isolados bacterianos em biofilmes multiespécies (constituídos pelos 5 isolados em estudo)	40
2.3.2.1	Produção de biofilmes	40
2.3.2.2	Estudo da eficácia do biocida nos biofilmes	41
2.3.2.2.1	Ensaio a 2, 6, 10 e 15 µg/mL	42
2.3.2.2.2	Ensaio a 16, 17, 18, 19 e 20 µg/mL	42
2.3.2.2.3	Ensaio a 30, 40, 50 e 100 µg/mL	42
2.3.3	Determinação da concentração mínima bactericida de cloreto de benzalcónio dos 3 isolados bacterianos mais resistentes ao biocida, em biofilmes constituídos por dois isolados bacterianos	43
2.3.4	Determinação da concentração mínima bactericida de cloreto de benzalcónio dos 3 isolados bacterianos resistentes em biofilmes constituídos por um isolado bacteriano	44
3.	Resultados e discussão	45
3.1	Sensibilidade a antibióticos dos isolados bacterianos selecionados	45
3.1.1	Bactérias Gram-negativas	45
	Tabela 1: Resultados obtidos do antibiograma realizado para os isolados de <i>E. coli</i> , <i>S. Typhimurium</i> e <i>P. aeruginosa</i>	45
3.1.2	Bactérias Gram-positivas	46
3.2	Determinação de concentrações mínimas inibitórias de cloreto de benzalcónio para cada isolado bacteriano na sua forma plantónica	47
3.3	Determinações das concentrações mínimas bactericidas dos 5 isolados bacterianos em biofilmes multiespécies	50
3.4	Determinação da concentração mínima bactericida de cloreto de benzalcónio dos 3 isolados bacterianos resistentes ao biocida em biofilmes constituídos 2 isolados bacterianos	56
3.5	Determinação da concentração mínima bactericida de cloreto de benzalcónio em biofilmes constituídos por um isolado bacteriano	60
	Conclusões gerais	62

Bibliografia.....	63
Anexos	72

Índice de Figuras

Figura 1: Representação esquemática da constituição das membranas celulares externas de bactérias Gram-negativas (a) e Gram-positivas (b) (Fonte: Denyer & Maillard, 2002).....	26
Figura 2: Representação esquemática da constituição da parede celular de micobactérias (Fonte: Hett & Rubin, 2008).....	27
Figura 3: Isolados bacterianos selecionados para a realização do trabalho experimental: <i>Staphylococcus</i> spp. LIS 7-S, <i>S. typhimurium</i> LIS-5, <i>P. aeruginosa</i> LIS-1P, <i>B. cereus</i> ATCC 11778 e <i>E.coli</i> ATCC 25922	37

Índice de Tabelas

Tabela 1: Resultados obtidos do antibiograma realizado para os isolados de <i>E. coli</i> , <i>S. Typhimurium</i> e <i>P. aeruginosa</i>	45
Tabela 2: Resultados obtidos do antibiograma realizado para os isolados de <i>B. cereus</i> e <i>Staphylococcus spp.</i>	46
Tabela 3: Concentrações mínimas inibitórias obtidas para cada isolado bacteriano	47
Tabela 4: Resultados obtidos para cada isolado bacteriano, em biofilmes multiespécies e sujeitas durante 30 minutos à ação do cloreto de benzalcônio a várias concentrações, com presença (+) ou ausência(-) de desenvolvimento bacteriano	50
Tabela 5: Resultados obtidos para cada isolado bacteriano, em biofilmes multiespécies e sujeitas durante 2 horas à ação do cloreto de benzalcônio a várias concentrações, com presença (+) ou ausência(-) de desenvolvimento bacteriano	51
Tabela 6: Resultados obtidos para cada isolado bacteriano em conjunto, em biofilmes multiespécies e sujeitas durante 24 horas à ação do cloreto de benzalcônio a várias concentrações , com presença (+) ou ausência(-) de desenvolvimento bacteriano	52
Tabela 7: Concentrações mínimas bactericidas de cloreto de benzalcônio para os 5 isolados em biofilme	52
Tabela 8: Resultados do antibiograma feito aos isolados de <i>E.coli</i> e <i>S. Typhimurium</i> sujeita à ação do biocida, em biofilme, na concentração de 2 µg/mL	55
Tabela 9: Concentrações mínimas bactericidas obtidas para os isolados de <i>P.aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. Typhimurium</i> , em biofilmes constituídos por dois isolados bacterianos, com presença (+) ou ausência(-) de desenvolvimento bacteriano	56
Tabela 10: Antibiograma feito para o isolado de <i>E. coli</i> que sobreviveu em biofilme com <i>P.aeruginosa</i> a 20 µg/mL	58
Tabela 11: Concentrações mínimas bactericidas de cloreto de benzalcônio obtidas para os isolados de <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. Typhimurium</i> , em biofilmes constituídos por um isolado bacteriano, com presença (+) ou ausência(-) de desenvolvimento bacteriano	60

Lista de abreviaturas

a.C- Antes de Cristo

ASTM - American Society for Testing and Materials

ATP - Adenosina Trifosfato

CEN - Comité Europeu de Normalização

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

CMB - Concentração mínima bactericida

CMI- Concentração mínima inibitória

d.C - Depois de Cristo

DGAV - Direção Geral de Alimentação e Veterinária

DGS - Direção Geral de Saúde

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ECHA - Agência Europeia de Produtos Químicos

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

ISO - Organização Internacional para a Normalização

LPS - Lipopolissacarídeos

OCDE - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico

PCA - Plate count agar

RNA - Ácido ribonucleico

SPE - Substâncias Poliméricas Extracelulares

TBX - Tryptone Bile X-Glucuronide agar

Descrição das atividades desenvolvidas durante o estágio

O estágio que proporcionou a realização da presente dissertação de mestrado foi realizado no Laboratório de Microbiologia Alimentar, localizado na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. O estágio iniciou-se a 4 de Janeiro de 2016 e terminou a 8 de Abril de 2016, com uma duração de 500 horas.

O estágio foi realizado sob a supervisão da Doutora Marília Ferreira, orientadora científica do estágio.

Ao longo do estágio, foi possível contactar com técnicas de isolamento e purificação de isolados bacterianos, sua caracterização e determinação de perfis de sensibilidade.

Numa primeira fase, o trabalho experimental teve o objetivo de determinar quais as concentrações mínimas inibitórias do desinfetante químico cloreto de benzalcónio sobre a forma plantónica de cinco isolados bacterianos. Na fase seguinte, este estudo foi feito em biofilmes constituídos por esses cinco isolados em conjunto. Desse estudo obtiveram-se três isolados que se revelaram resistentes ao biocida, e procedeu-se então à determinação de concentrações mínimas bactericidas do biocida em biofilmes compostos por esses três isolados. Na última fase do trabalho, essas determinações foram feitas em biofilmes compostos apenas por cada um dos três isolados.

No início do trabalho experimental, foi necessário seleccionar os isolados bacterianos que iriam ser usadas ao longo de toda a experiência. Foram seleccionadas cinco isolados: *Staphylococcus* spp LIS 7-S, *Salmonella* Typhimurium LIS-5, *Pseudomonas aeruginosa* LIS-1P, *Bacillus cereus* ATCC 11778 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Feita a seleção, procedeu-se à purificação de cada espécie em meio sólido apropriado, e a partir daí fez-se o seu isolamento para o meio Plate-Count agar em tubos eppendorf. Esses isolados foram usados ao longo de grande parte do trabalho experimental. Posteriormente foi necessário proceder à revivificação dos isolados e, para tal, procedeu-se do mesmo modo descrito anteriormente. Contudo, a conservação foi feita em tubos contendo glicerol.

Previamente à realização dos ensaios com o biocida cloreto de benzalcónio, foram feitos antibiogramas a cada isolado bacteriano para avaliar qual a suscetibilidade de cada um a vários agentes antimicrobianos.

No que diz respeito ao ensaio com o desinfetante cloreto de benzalcónio, o trabalho experimental dividiu-se em quatro fases. Na primeira fase, foi testado o efeito do desinfetante em cada um dos isolados bacterianos na sua forma plantónica. Nesta fase, foram feitas suspensões de cada isolado bacteriana em meio nutritivo Nutrient-Broth, e foram feitas várias diluições decimais com o desinfetante de modo a obter diluições contendo concentrações diferentes do desinfetante. Estas diluições foram depois adicionadas às suspensões bacterianas e foram determinadas quais as concentrações

mínimas inibitórias para cada isolado. Na segunda fase do trabalho experimental, procurou determinar-se qual a concentração mínima bactericida de cada uma dos 5 isolados bacterianos, que se encontravam em conjunto em biofilmes multiespécies (constituídos pelos 5 isolados em simultâneo). Estes ensaios tiveram a duração de várias semanas e alguns procedimentos foram repetidos várias vezes da mesma forma. Para fazer os biofilmes, adotou-se o seguinte procedimento: foi feita uma suspensão em caldo nutritivo Nutrient Broth contendo todas as espécies isoladas. A partir dessa suspensão, semeava-se 10 µL em vários tubos de ensaio contendo também caldo nutritivo. Esses tubos de ensaio eram deixados a incubar 48h a 30°C, obtendo-se no fim os biofilmes. Para a obtenção de diferentes concentrações de biocidas, foram feitas várias diluições decimais recorrendo novamente ao caldo-nutritivo Nutrient-Broth. As soluções obtidas eram depois adicionadas aos tubos de ensaio onde se encontravam os biofilmes e o seu efeito estudado. A observação do efeito do biocida era feita através da sementeira a partir dos tubos de ensaio contendo os biofilmes sob o efeito do biocida em meios de cultura próprios para cada espécie bacteriana. Para obtenção destes meios de cultura, foi necessário proceder à sua produção, semanalmente, recorrendo ao armazém de Inspeção Sanitária da Faculdade de Medicina Veterinária, e ao autoclave localizado no mesmo espaço.

Na terceira fase do trabalho experimental, determinou-se quais as concentrações mínimas bactericidas do biocida em biofilmes compostos pelos isolados que se revelaram mais resistentes ao biocida, nomeadamente: *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* e *E. coli*. Na quarta e última fase, foram determinadas as concentrações mínimas bactericidas do biocida em biofilmes compostos apenas por cada um dos três isolados referidos anteriormente. Para obter os biofilmes, bem como diferentes concentrações de biocidas, os procedimentos adotados foram os mesmos já descritos.

O presente trabalho experimental proporcionou o aprofundamento dos conhecimentos de técnicas de laboratório e de microbiologia, constituindo uma mais valia na evolução deste percurso académico.

Introdução

Os biocidas compreendem um grupo vasto de produtos amplamente utilizado em medicina humana, veterinária, indústria alimentar e em ambientes domésticos, com o objetivo de prevenir ou reduzir o desenvolvimento de microrganismos potencialmente patogénicos. A crescente utilização destes produtos implica a necessidade de expandir o conhecimento em relação aos mesmos, de modo a garantir que o seu uso seja eficaz e não tenha efeitos nefastos nos utilizadores e no meio ambiente. Como tal, é importante saber quais as condições de aplicação destes produtos, bem como os microrganismos-alvo. O desconhecimento da população microbiana que se encontra presente nos locais onde os biocidas são aplicados promove uma utilização inadequada dos biocidas, com tempos de exposição e concentrações incorretas. Desta forma, é fundamental ter um conhecimento aprofundado da eficácia do produto que se está a utilizar.

De modo a adquirir este conhecimento, foram desenvolvidos vários procedimentos experimentais reconhecidos internacionalmente para avaliar a eficácia dos biocidas. As autoridades competentes de cada país recorrem aos dados obtidos a partir destes procedimentos para aprovar a comercialização dos produtos biocidas.

Uma das formas de estudar a eficácia de um biocida é através da determinação da sua concentração mínima bactericida (CMB) em certas espécies bacterianas. Alguns autores referem que a CMB tem sido usada como “gold standard” na determinação das suscetibilidades a antimicrobianos em bactérias potencialmente patogénicas em humanos e animais. Aceita-se que um antimicrobiano que seja ineficaz na prevenção do desenvolvimento de um microrganismo particular em ensaios de determinação de CMB, também será clinicamente ineficaz. Contudo, é importante realçar que um microrganismo que seja suscetível *in vitro* pode não o ser *in vivo*. Apesar da CMB de um determinado antimicrobiano nem sempre prever a sua eficácia clínica, continua a ser um método fiável para selecionar antimicrobianos potencialmente eficazes. Assim sendo, justifica-se recorrer à determinação de CMB no estudo da eficácia de biocidas.

Por outro lado, os biofilmes são comunidades complexas de microrganismos e que constituem uma barreira à utilização de biocidas, porque são menos suscetíveis à sua ação. Tendo em conta os pressupostos mencionados, o presente trabalho experimental visou estudar a eficácia do biocida cloreto de benzalcónio, que é um biocida atualmente bastante utilizado a nível industrial e da medicina humana e veterinária, através da determinação da sua CMB em cinco isolados bacterianos, nas suas formas plantónicas e em biofilmes.

I. Revisão Bibliográfica

1. Biocidas

1.1 Breve história dos biocidas e da sua importância em Medicina Veterinária e na Sociedade

Até ao século XIX, o conhecimento relativo à origem das doenças em humanos e animais era escasso. Contudo, desde os primórdios da civilização sempre se suspeitou da existência de “animálculos”, ou seja, animais de dimensões muito reduzidas, com ação prejudicial na saúde (Blancou, 1995).

Já no século I a.C, Terentius Varro escreveu *“Talvez existam, em locais pantanosos, animais que são invisivelmente pequenos, e que provocam doenças graves ao invadirem o corpo através da boca ou do nariz”* (Blancou, 1995).

Ainda de acordo com Blancou (1995), a referência mais antiga à utilização de desinfetantes químicos foi feita por Homero, que descreve no livro “Odisseia” como se incendiava com enxofre as casas dos inimigos mortos, com o objetivo de obter um efeito purificador, sendo este efeito subsequentemente aplicado em várias ocasiões, como por exemplo, na Índia, durante o século IV d.C., em que era usado nas divisões onde se procedia à realização de operações cirúrgicas. O mesmo autor menciona ainda que se utilizava o dióxido de enxofre durante a idade média, na Europa, para a desinfecção de instalações e objetos, referindo que a utilização deste composto terá derivado da observação das suas ações letais em pequenos animais e plantas e pela facilidade com que os vapores eram produzidos por simples combustão.

Blancou (1995), também descreve a utilização de compostos de mercúrio como desinfetantes na China, Índia, Egito e Europa, resultante da observação dos seus efeitos tóxicos, e refere que a sua utilização em medicina foi desenvolvida pelos árabes, que transmitiram esse conhecimento aos europeus. Os compostos de mercúrio também foram usados no século XIII d.C para combater a sífilis na Itália, sendo que posteriormente, alguns compostos orgânicos de mercúrio começaram a ter aplicação em medicina humana e veterinária (Blancou, 1995).

Blancou (1995), descreve ainda a existência de relatos das primeiras preparações de detergentes alcalinos, que eram à base de lima ou sódio, e que remontam ao século XVIII, período em que a Europa foi assolada pela peste bovina, referindo que uma das principais medidas adotadas pelas autoridades dos países afetados consistiu na desinfecção de áreas e materiais com cal de soda.

Posteriormente, a cal de soda foi usada como desinfetante das instalações e objetos em vários episódios de pragas que afligiram os animais na Europa. Os ácidos também estão

descritos como tendo sido usados por embalsamadores, médicos e veterinários devido à sua forte ação corrosiva em superfícies duras (pedra e metal) e à ação de preservação dos ácidos orgânicos (como o vinagre) em frutas e vegetais (Blancou, 1995).

Os antigos egípcios usavam vinho de palma e vinagre para enxaguar a cavidade abdominal de humanos e animais previamente ao embalsamento e no século I d.C., já se recomendava a utilização de vinagre na desinfecção de feridas (Blancou, 1995).

Em 1676, Anton van Leeuwenhoek provou cientificamente a ação dos ácidos sobre os “animálculos”, quando observou ao microscópio que a sua atividade cessava depois de expostos a esses compostos. Nos séculos seguintes, a utilização de vinagre tornou-se recorrente na desinfecção de objetos e instalações em áreas que tivessem sido assoladas por pragas (Blancou, 1995).

Atualmente, a importância dos biocidas estende-se a várias áreas do espectro de atividade humana. As suas áreas de aplicação incluem a medicina humana e veterinária, cosmética, indústria alimentar, produção animal e ambiente (Rutala & Weber, 2013).

Em medicina humana e veterinária, os biocidas são usados sobretudo na desinfecção de equipamentos médicos não críticos, ou seja, aqueles equipamentos que apenas entram contacto com a pele intacta ou que não contactam com o paciente, como é o caso de estetoscópios e aparelhos de eletrocardiografia (Rutala & Weber, 2013).

Os biocidas são também usados para a desinfecção de superfícies, como o chão, paredes, mesas, entre outras. Outra aplicação dos biocidas consiste em reduzir ou eliminar microrganismos patogénicos da pele de pacientes e dos profissionais de saúde, como é o caso dos desinfetantes usados para as mãos, recorrendo-se a produtos à base de álcool, como o etanol e o isopropanol, à clorexidina e a compostos de amónio quaternário (Rutala & Weber, 2013).

Na indústria alimentar, recorre-se aos biocidas para desinfetar equipamentos, superfícies, e materiais usados para a produção transporte e armazenamento de alimentos ou água (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, 2009).

Os biocidas são também utilizados como conservantes de modo a aumentar o tempo de semi-vida dos alimentos (SCHENIR, 2009).

Já em produção animal, os biocidas são usados para desinfetar os locais em que os animais habitam, como barreiras que previnem a entrada de microrganismos patogénicos (pedilúvios) ou em aplicação directa nos animais, como é o caso dos desinfetantes usados antes e depois da ordenha dos bovinos (SCHENIR, 2009).

Os biocidas são ainda usados com frequência no tratamento de águas e em materiais de construção, de forma a evitar a formação de biofilmes (SCHENIR, 2009).

1.2 Biocidas e a sua definição

A palavra “biocida” resulta da junção da palavra grega “bios”, que significa vida, e da palavra latina “cida”, que significa matar, obtendo a tradução literal de “matar a vida” (Rossmoore,1995).

De acordo com o Regulamento nº 528/2012 relativo à disponibilização no mercado e à utilização de produtos biocidas, um produto biocida é definido como “qualquer substância ou mistura, na forma em que são fornecidos ao utilizador, que consistam, contenham ou que gerem uma ou mais substâncias ativas, com o objetivo de destruir, repelir ou neutralizar um organismo prejudicial, prevenir a sua ação ou controlá-la de qualquer outra forma, por meios que não sejam a simples ação física ou mecânica”.

A substância ativa, por sua vez, é definida como uma “substância ou um microrganismo que exerça uma ação sobre ou contra organismos prejudiciais” (Regulamento nº 528/2012).

Os biocidas, são portanto, agentes antimicrobianos aplicados em várias esferas da atividade humana, para eliminar ou inibir o crescimento microbiano (Cloete, Jacobs & Brözel,1998). Podem ser divididos em dois grupos, os que ocorrem naturalmente e são maioritariamente produzidos por organismos procarióticos (antibióticos) e os que não são de origem natural, nomeadamente os antisépticos, desinfetantes e conservantes. Os do segundo grupo são classificados de acordo com a sua natureza química ou local de aplicação (Cloete *et al.*, 1998).

Os antibióticos inibem ou destroem seletivamente microrganismos, normalmente em concentrações baixas. Já os antisépticos são biocidas que inibem ou destroem microrganismos em tecidos vivos (usados na lavagem das mãos, por exemplo), enquanto que os desinfetantes são biocidas aplicados a objectos inanimados ou superfícies. Os conservantes destinam-se à prevenção do desenvolvimento de microrganismos em produtos formulados, que incluem produtos farmacêuticos e alimentares (McDonnell & Russell, 1999). Como os biocidas têm uma ação antimicrobiana variada, podem utilizar-se definições mais específicas, como bacteriostáticos, fungistáticos e esporostáticos, no caso de inibirem o crescimento. Caso matem o microrganismo são designados por bactericidas, fungicidas ou esporocidas (McDonnell & Russell, 1999).

1.3 Critérios de seleção dos biocidas

Embora a necessidade de utilização de biocidas não tenha diminuído, a sua aplicação e seleção tem sofrido restrições cada vez maiores nas últimas décadas, sendo que estas restrições surgem devido a dois problemas fundamentais, a toxicidade dos produtos utilizados e o seu impacto ambiental (Pereira, 2001).

A eficácia dos produtos deve ser sustentada por testes laboratoriais apropriados e testes em campo (Rossmore, 1995).

A utilização errada de biocidas não conduz a um resultado esperado e é dispendiosa. Como tal, é importante que a seleção dos biocidas seja feita de forma correta (Cloete *et al.*, 1998). Pereira (2001), concluiu que os principais parâmetros a ter em consideração aquando da seleção de um biocida são os seguintes:

- O biocida deve ser ativo contra uma vasta gama de microrganismos;
- A sua toxicidade deve ser elevada, a baixas concentrações, para os microrganismos alvo, e possuir toxicidade baixa para as restantes formas de vida;
- Deve ser biodegradável;
- Não deve ser corrosivo para materiais e equipamentos;
- Deve ser estável mesmo em presença de alterações de pH e de temperatura;
- A presença de materiais orgânicos ou inorgânicos não deve interferir com a eficiência do biocida;
- Deve ser compatível com outros aditivos (inibidores da corrosão, por exemplo);
- É necessário ter em conta os custos associados à utilização do biocida;
- É importante ter em conta a segurança no que diz respeito à saúde, armazenamento e manuseamento e as implicações ambientais e efeitos toxicológicos;

O passo seguinte é garantir que o programa de utilização de biocidas tenha sucesso, e para isso, Cloete *et al.* (1998) definiram as seguintes práticas que devem ser seguidas por rotina:

- É necessário conhecer os microrganismos que se pretendem eliminar;
- Deve ser selecionada a substância ativa ou combinação de substâncias ativas adequadas;
- Deve determinar-se as concentrações corretas a usar e a frequência de aplicação através de métodos científicos;
- O nível de microrganismos deve ser controlado através de análises microbiológicas;

Ainda segundo os mesmos autores, um problema que surge aquando da seleção do biocida é que a concentração mínima inibitória dos diferentes biocidas e o tempo de contacto necessário para que estes exerçam a sua ação são informações que só podem ser determinadas quando a população microbiana é conhecida, algo que normalmente não acontece, resultando numa aplicação ineficaz.

1.4 A Avaliação de biocidas

Tendo em conta os critérios referidos, para que se proceda a uma correta seleção dos biocidas, justifica-se a existência de uma avaliação da eficácia e segurança do produto (Regulamento nº 528/2012).

1.4.1 Avaliação da eficácia

Para que seja possível a colocação do produto no mercado, a pessoa ou entidade responsável pela sua comercialização deve apresentar às autoridades competentes dados que demonstrem a eficácia do produto contra os organismos visados. Os ensaios que permitem demonstrar tal eficácia devem ser realizados de acordo com as orientações internacionais ou da União Europeia (Regulamento nº 528/2012).

Atualmente existem métodos experimentais que permitem avaliar a eficácia dos produtos biocidas e que foram estabelecidos pelo Comité Europeu de Normalização (CEN), pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE) e pela Organização Internacional para a Normalização (ISO). Qualquer um destes métodos pode ser utilizado com o objetivo de obter dados que comprovem a eficácia do produto e obter a aprovação das autoridades competentes para que sejam comercializados (Agência Europeia de Produtos Químicos, 2016).

A maioria dos protocolos que testam a eficácia de desinfetantes baseam-se no teste de suspensão. O princípio deste teste consiste na junção de um desinfetante a uma população microbiana suspensa em meio líquido durante um determinado período de tempo, seguindo-se a deteção de microrganismos sobreviventes após neutralização. O teste de suspensão pode ser quantitativo, quando se determina o número de bactérias sobreviventes, ou qualitativo, no caso de apenas se proceder à observação de ausência/presença de crescimento bacteriano (Maillard, 2005).

Os protocolos que definem os métodos experimentais referentes à testagem da eficácia dos biocidas são classificados em três grupos, de acordo com os objetivos do teste: testes de fase 1 ou preliminares, testes de fase 2 e testes de fase 3 ou de campo (ECHA, 2016).

Fase 1 ou testes preliminares- Os testes de fase 1 são testes de suspensão qualitativa cujo objetivo é determinar qual é a ação básica do biocida, a determinadas concentrações e durante um período de tempo definido. Os testes da fase 1 são usados quando um produto está em fase de desenvolvimento e não podem ser usados para obter autorização de comercialização (ECHA, 2016).

Fase 2- Os testes de fase 2 compreendem dois tipos de testes:

- Fase 2, etapa 1: procede-se à realização de testes de suspensão para estabelecer a que concentrações é que um determinado produto exerce as suas propriedades bactericidas, fungicidas, virucidas, entre outras, tendo em consideração as diferentes condições de utilização do produto (temperatura, tempo de contacto e presença de substâncias interferentes). Dependendo do objetivo do método, estes testes são classificados como testes de suspensão quantitativos ou de capacidade. Nos testes de suspensão quantitativos, amostras de células não tratadas e tratadas pelo biocida são semeadas num meio nutritivo após a neutralização. Passado o período de incubação, determina-se o número de unidades formadoras de colónias. Por outro lado, nos testes de capacidade, são feitas várias inoculações sucessivas de suspensão bacteriana ao biocida em intervalos de tempo definidos. Após cada inoculação e decorrido o período de contacto definido, é retirada uma amostra, o biocida é neutralizado, e a amostra é incubada em meio de crescimento adequado para determinar quais os microrganismos que sobreviveram. Desta forma, determina-se em que altura é que a atividade do biocida (capacidade) se esgotou (ECHA, 2016).
- Fase 2, etapa 2: neste teste, procede-se à simulação, em laboratório, das condições observadas em cenário real, através da utilização de superfícies e instrumentos nos quais são introduzidos microrganismos, seguindo-se a adição do desinfetante. Após um determinado tempo de contacto, procede-se à neutralização do desinfetante e realiza-se a contagem dos microrganismos sobreviventes (ECHA, 2016).

Fase 3 ou testes de campo- Os testes de fase 3 são testes realizados em campo. Realizam-se testes que avaliam a atividade antimicrobiana de um produto no exterior, sob condições reais, em superfícies ou materiais específicos e num ambiente específico. Atualmente não existe nenhum teste desta natureza validado, embora alguns estejam em desenvolvimento. As condições às quais um biocida é sujeito em cenário real são muito variáveis, e como tal é difícil uniformizar estes procedimentos experimentais. Apesar de não serem testes validados, permitem obter informações importantes no que diz respeito à eficácia do produto se os estudos forem cientificamente credíveis, bem documentados e se responderem claramente às questões colocadas (ECHA, 2016).

1.4.1.1 Desenvolvimento de metodologias de avaliação da eficácia dos biocidas

Idealmente, os dados relativos à eficácia dos biocidas devem ser obtidos recorrendo a métodos de ensaio reconhecidos a nível internacional ou nacional, tais como os que foram desenvolvidos pelo CEN, OCDE e ISO (ECHA,2016).

Contudo, no caso de não existirem procedimentos experimentais para testar um modo de aplicação específico do desinfetante em causa, ou os procedimentos existentes não serem adequados, é possível recorrer a outros métodos, desde que estes sejam cientificamente relevantes, bem documentados e proporcionem respostas claras às questões (ECHA,2016). Nestas circunstâncias, os métodos de ensaio utilizados em conjunto com as condições em que o produto é testado devem ser claramente descritos e devem justificar a eficácia que é declarada no rótulo do produto. Assim sendo, é possível realizar a alteração de procedimentos experimentais já existentes de modo a adequarem-se a um produto com condições de utilização específicas (ECHA,2016).

Por outro lado, atualmente existe uma grande variabilidade nos resultados obtidos no que diz respeito à atividade antimicrobiana de um determinado biocida, devido às adaptações feitas nos protocolos utilizados. Como tal, há a necessidade de melhorar os protocolos existentes no sentido de padronizá-los (Maillard, 2005).

1.4.2 Fatores que alteram a eficácia dos biocidas

É importante ter em conta que quando se procede à aplicação dos biocidas no meio ambiente, existem fatores que podem alterar a sua eficácia. Estes podem ser intrínsecos ao microorganismo ou relacionados com as características químicas e físicas do ambiente (Rutala *et al.*, 2008).

O conhecimento destes fatores é fundamental de modo a garantir que a utilização do biocida seja adequada (Rutala *et al.*, 2008). Assim sendo, os principais fatores que podem modificar a eficácia dos biocidas são os seguintes:

1.4.2.1 Número e localização dos microrganismos

Quanto maior o número de microrganismos, maior será o tempo de contato necessário para que o biocida atue sobre os mesmos. O número de microrganismos pode ser reduzido ou inativado através de um processo de limpeza cuidadoso que anteceda a desinfecção, o que permite aumentar a margem de segurança quando o biocida é aplicado segundo as instruções e diminui o tempo de exposição necessário para destruir a carga microbiana presente. A localização também é um fator a ter em conta, visto que superfícies ou instrumentos com várias peças são mais difíceis de desinfetar do que superfícies e

instrumentos planos. Apenas a superfície que entra em contacto com o desinfetante vai sofrer a sua ação, sendo por isso importante que toda a superfície esteja coberta pelo biocida (Rutala *et al.*, 2008).

1.4.2.2 Resistência Intrínseca dos microrganismos

O conhecimento detalhado dos mecanismos de resistência dos microrganismos aos biocidas, tal como os mecanismos de ação dos biocidas são pouco compreendidos atualmente. Mas aceita-se que alguns dos mecanismos envolvidos na resistência a antibióticos são os mesmos que atuam na resistência aos biocidas desinfetantes, como é o caso da redução da entrada do biocida por impermeabilidade ou efluxo (Russel, 2002).

À exceção dos priões, os esporos bacterianos são os que possuem uma maior resistência intrínseca aos biocidas químicos, seguidos pelas coccídeas, como é o caso de *Cryptosporidium* sp, micobactérias como *Mycobacterium tuberculosis*, alguns vírus tais como o herpesvírus e o poliovírus, fungos e leveduras como *Aspergillus* e *Candida* spp. e por fim, as bactérias na sua forma plantónica. Assim sendo, deve ter-se em conta que o microrganismo mais resistente é o que vai condicionar o modo de aplicação do biocida, ou seja, para destruir os tipos mais resistentes, é necessário que o tempo de exposição e a concentração sejam os adequados para garantir a destruição completa desses microrganismos (Rutala *et al.*, 2008).

1.4.2.3 Concentração e potência dos biocidas

O efeito dos biocidas é dependente da sua concentração (Araújo, Lemos, Mergulhão, Melo & Simões, 2011). De uma forma geral, quanto maior a concentração do biocida, maior a sua eficácia e menor o tempo necessário para atingir a morte microbiana (Russel & McDonnell, 2000).

O que sucede muitas vezes na aplicação prática, é que o desinfetante pode encontrar-se diluído devido à água residual que resulta no final do processo de limpeza, diminuindo assim a sua eficácia. De modo a evitar esta situação, os equipamentos devem ser desenhados de modo a facilitar o escoamento de água impedindo a sua acumulação (Araújo *et al.*, 2011).

A potência também é importante, pelo que há alguns desinfetantes que necessitam de mais tempo do que outros para atingir o mesmo nível de eficácia (Rutala *et al.*, 2008).

1.4.2.4 Fatores físicos e químicos

A atividade dos biocidas também depende não só das suas características químicas, como também das características químicas e físicas do meio onde é aplicado, nomeadamente o pH, a temperatura, a dureza da água, a presença de compostos orgânicos (como proteínas) e de aditivos, como os inibidores da corrosão, que podem ligar-se ao biocida inibindo a sua ação (Cloete *et al.*, 1998).

Um aumento do pH promove a ação de alguns biocidas, como o glutaraldeído e os compostos de amónio quaternário, mas inibe a atividade de outros, como os fenóis, hipocloritos e iodo. O pH influencia a atividade antimicrobiana porque altera a molécula do desinfetante ou a superfície celular. A humidade relativa influencia a eficácia de desinfetantes gasosos como o dióxido de cloro e o formaldeído. A dureza elevada da água, com elevadas concentrações de catiões, como o magnésio e o cálcio, reduz a eficácia de certos desinfetantes uma vez que estes catiões podem reagir com os desinfetantes formando precipitados insolúveis (Rutala *et al.*, 2008).

De uma forma geral as temperaturas elevadas inativam a substância ativa (Cloete *et al.*, 1998).

A presença de compostos orgânicos e inorgânicos potencia uma reação química entre o biocida e esses compostos, levando à formação de complexos que são menos eficazes e diminuindo a quantidade de substância ativa disponível para atuar em microrganismos. Daí se realça a importância de executar uma boa limpeza de equipamento e superfícies antes de se proceder à aplicação de biocidas desinfetantes (Rutala *et al.*, 2008).

1.4.2.5 Duração da exposição

As superfícies e objetos devem ser expostos ao biocida durante um tempo apropriado e, de uma forma geral, quanto maior o tempo de contacto, maior a eficácia da desinfecção (Rutala *et al.*, 2008).

Ainda de acordo com Rutala *et al* (2008), vários investigadores já demonstraram a eficácia de alguns desinfetantes em bactérias plantónicas, fungos, micobactérias e vírus com tempos de exposição compreendidos entre 30-60 segundos.

1.4.3 Avaliação da segurança dos biocidas

O Regulamento nº 528/2012 determina que devem ser feitos estudos sobre os efeitos dos biocidas na saúde humana, animal e no meio ambiente.

Ao nível da saúde humana e animal, o mesmo Regulamento estabelece que os efeitos que devem ser avaliados são a toxicidade aguda, a irritação, a corrosividade, a sensibilização, a toxicidade por dose repetida, a mutagenicidade, a carcinogenicidade, a neurotoxicidade, a imunotoxicidade, a toxicidade para a reprodução e a desregulação do sistema endócrino.

Com o objetivo de uniformizar os métodos de experimentação que visam determinar essas características, foi criado o Regulamento nº 440/2008 que estabelece métodos de ensaio nos termos do Regulamento (CE) n.º 1907/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo ao registo, avaliação, autorização e restrição de substâncias químicas (REACH). Este regulamento estabelece quais os métodos de ensaio que devem ser adotados de modo a determinar os efeitos de uma substância ativa a nível da saúde animal, humana e no meio ambiente. Essas informações são analisadas pelas autoridades competentes e contribuem para decidir se um determinado produto biocida cumpre os requisitos para que a sua venda seja autorizada (Regulamento nº 528/2012).

1.5 A comercialização de biocidas

Para que um produto biocida seja comercializado, é necessário, em primeiro lugar, obter autorização para o efeito. Assim sendo, a nível da União Europeia foi criado o Regulamento nº 528/2012, que estabelece as regras de disponibilização e comercialização de produtos biocidas no mercado. De acordo com este regulamento, a pessoa ou entidade responsável que pretenda comercializar o produto deve formular um pedido de autorização e apresentá-lo à autoridade competente do Estado-Membro onde se deseja efetuar a comercialização do produto (Regulamento nº 528/2012).

Em Portugal, existem três autoridades competentes responsáveis por conceder esta autorização: a Direção Geral de Veterinária (DGAV), Direção Geral de Saúde (DGS) e a Direção-Geral de Proteção de Culturas . À DGAV compete conceder autorizações aos produtos biocidas de uso veterinário, a Direção-Geral de Proteção e Culturas confere autorização aos produtos conservantes da madeira e à DGS compete conceder autorizações aos restantes tipos de produtos biocidas (Decreto-Lei nº 121/2002).

Caso se pretenda a comercialização do produto noutros Estados-Membros, o pedido de autorização deve ser apresentado à ECHA. Após ser concedida a autorização de comercialização, esta tem uma validade de 10 anos, ao fim dos quais o responsável pela

comercialização pode pedir a renovação da autorização, desde que se mantenham os requisitos exigidos (Regulamento nº 528/2012).

No âmbito da obtenção da autorização para comercialização de um produto biocida, estão estabelecidos requisitos que os produtos devem cumprir para que esta seja concedida. Estes requisitos aplicam-se às substâncias ativas contidas no produto e ao produto em si. No que diz respeito às substâncias ativas, estabeleceu-se que estas devem estar aprovadas previamente a ser comercializadas. Para tal, deve ser possível determinar as suas identidades químicas, a sua quantidade, impurezas e substâncias não ativas significativas do ponto de vista toxicológico ou ecotoxicológico, bem como os resíduos relevantes do ponto de vista toxicológico ou ambiental resultantes das utilizações a autorizar (Regulamento nº 528/2012).

O mesmo regulamento estabelece ainda que o produto biocida deve satisfazer os seguintes critérios:

- Deve ser suficientemente eficaz;
- Não pode ter efeitos inaceitáveis nos organismos visados, em particular fenómenos de resistência ou resistência cruzada inaceitáveis, ou causar dor e sofrimento desnecessários nos vertebrados;
- Não deve ter por si só nem em consequência dos seus resíduos, efeitos inaceitáveis, imediatos ou a longo prazo, na saúde dos seres humanos, incluindo a saúde dos grupos vulneráveis, nem na saúde dos animais, diretamente ou através da água potável, dos géneros alimentícios, dos alimentos para animais ou do ar, ou através de quaisquer outros efeitos indiretos;
- Não deve ter, por si mesmo nem em consequência dos seus resíduos, efeitos inaceitáveis no ambiente;

Não é autorizada a disponibilização no mercado do produto biocida, para utilização pelo público, se este for considerado de toxicidade elevada ou causar toxicidade aguda por via oral, cutânea ou inalatória, se for considerado cancerígeno, mutagénico ou tóxico para a reprodução, se apresentar propriedades perturbadoras para o sistema endócrino e se tiver efeitos neurotóxicos e imunotóxicos para o desenvolvimento (Regulamento nº 528/2012).

1.6 Mecanismos de ação dos biocidas

O conhecimento relativo aos mecanismos de ação antibacteriana dos antisépticos e desinfetantes foi evoluindo ao longo das últimas décadas (McDonell & Russel, 1999).

De uma maneira geral os biocidas atacam componentes celulares funcionais, colocando as bactérias sob stress, sendo que em concentrações baixas tendem a atuar como bacteriostáticos, adquirindo uma ação bactericida apenas em concentrações elevadas (Cloete *et al.*, 1998).

De modo a atingirem estes componentes, há uma interação prévia com a membrana celular, cuja natureza e composição é variável com os microrganismos e com as condições do ambiente. Assim sendo, esta interação inicial com a superfície celular pode influenciar a eficácia dos agentes biocida (McDonell & Russel, 1999).

Estão definidos os seguintes mecanismos de ação dos biocidas: reações de oxidação, reações cruzadas, e coagulação intracelular. Estas ações culminam na disrupção das estruturas celulares (Denyer & Maillard, 2011).

1.6.1 Reações de oxidação

Os biocidas com capacidade oxidante, isto é, com capacidade de remover eletrões, são amplamente usados como desinfetantes e esterilizantes químicos e incluem os compostos à base de halogénios (cloro, hipocloritos, iodóforos) e os peróxidos (peróxido de hidrogénio e ácido paracético). Estes compostos exercem efeitos específicos em macromoléculas microbianas essenciais, provocando quebras nas cadeias poliméricas e redução da formação de ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA), com disrupção dos processos de replicação, transcrição e tradução. Provocam ainda a degradação de ácidos gordos não saturados, com perda da fluidez da membrana e consequente redução da funcionalidade das proteínas ligadas à membrana. Têm ainda o efeito de alterar as ligações dissulfídicas responsáveis por manter a integridade das proteínas. A acumulação destes efeitos é devastadora para a célula microbiana (Denyer & Maillard, 2011).

1.6.2 Reações cruzadas (“cross-linking”)

Existem compostos altamente reativos, como é o caso dos agentes alquilantes, que provocam reações cruzadas. Os agentes alquilantes reagem fortemente com os resíduos de guanina, originando reações cruzadas entre cadeias de DNA, o que impede a sua separação no processo de replicação e impede também a transcrição do RNA. Os grupos amina carboxil, hidroxil e sulfidril, que fazem parte de algumas enzimas, também podem sofrer alquilação, sofrendo reações cruzadas com aminoácidos adjacentes ou outras

estruturas que também possuem aminoácidos, como os peptidoglicanos. Como consequência de reações cruzadas progressivas, há perda de função de macromoléculas, com inibição ou paragem de funções celulares essenciais (Denyer & Maillard, 2011).

1.6.3 Coagulação intracelular

As reações cruzadas descritas anteriormente dão origem à desnaturação e precipitação de macromoléculas, um processo que é designado por coagulação intracelular. Estes efeitos não são únicos dos agentes alquilantes. Os desinfetantes como a clorexidina, etanol, fenol e sais de mercúrio podem provocar coagulação intracelular (Denyer & Maillard, 2011).

1.7 Classificação química dos biocidas

No que diz respeito aos biocidas disponíveis atualmente, consideram-se as seguintes classes (McDonell & Russel, 1999; Barah, 2013):

1.7.1.1 Álcoois

Nesta categoria, os mais utilizados são o álcool etílico, o álcool isopropílico e o n-propanol. Os álcoois apresentam um largo espetro de atividade antimicrobiana contra bactérias vegetativas (incluindo micobactérias), vírus e fungos, não sendo, contudo esporocidas. Como tal, são usados sobretudo para a desinfeção de superfícies e como antisépticos para a pele. Usados em baixas concentrações, podem potenciar a atividade de outros biocidas, sendo que muitos produtos à base de álcool contêm pequenas concentrações de outros biocidas (McDonell & Russel, 1999).

No que diz respeito ao seu mecanismo de ação, a hipótese mais aceite é a de que os álcoois provocam danos na membrana celular e a desnaturação rápida de proteínas, o que interfere com o metabolismo celular e culmina na lise das células (Rutala *et al.*, 2008).

1.7.1.2 Aldeídos

Os aldeídos atualmente utilizados como biocidas incluem o glutaraldeído e o formaldeído.

1.7.1.2.1 Formaldeído

O formaldeído é o aldeído mais simples, geralmente utilizado em solução aquosa ou em combinação com vapores a baixas temperaturas, como desinfetante e esterilizante (Barah, 2013).

Este composto é altamente reativo, actuando como agente alquilante dos grupos amina, carboxil, hidroxil e sulfidril das proteínas. Também reage extensivamente com o DNA e RNA, provocando reações cruzadas e impedindo a síntese dessas moléculas. Este composto tem ação bactericida, esporocida e fungicida, mas atua mais lentamente que o glutaraldeído (McDonell & Russel, 1999).

1.7.1.2.2 Glutaraldeído

O glutaraldeído é um aldeído amplamente utilizado como esterilizante e desinfetante, em particular na desinfecção a baixas temperaturas de equipamentos médicos e cirúrgicos (McDonell & Russel, 1999).

O mecanismo de ação do glutaraldeído consiste na sua forte reação com aminas desprotonadas na superfície da célula microbiana (McDonell & Russel, 1999). Como o glutaraldeído é altamente reativo com os grupos amina, carboxil, hidroxil e sulfidril das proteínas, provoca ainda alterações ao nível do DNA, RNA e inibição da síntese proteica (Rutala *et al.*, 2008).

Este composto é mais eficaz em meios alcalinos e tem um largo espectro de atividade contra as bactérias e os seus esporos, fungos e vírus. Em concentrações baixas inibe a germinação de esporos, ao passo que em concentrações elevadas é esporocida (Barah, 2013).

1.7.1.3 Biguanidas

Várias biguanidas são usadas como desinfetantes, sendo a clorexidina o composto mais relevante, alexidina e biguanidas poliméricas (Barah, 2013).

1.7.1.3.1 Clorexidina

A clorexidina é atualmente um dos biocidas mais amplamente utilizados na prevenção e controlo de doenças infecciosas, nomeadamente na área de medicina dentária, tendo também aplicação como preservante em produtos farmacêuticos e como desinfetante de instrumentos médicos e superfícies. O sua larga utilização deve-se ao facto deste composto ter uma forte atividade antimicrobiana, atuando sobre bactérias Gram-negativas, positivas e fungos, e por possuir baixos níveis de toxicidade (Cheung *et al.*, 2012). A clorexidina também atua sobre vírus que contenham envelope lipídico, sendo ineficaz contra vírus sem envelope. Embora não tenha ação esporocida, este composto inibe o desenvolvimento dos esporos bacterianos (McDonell & Russel, 1999).

A clorexidina tem um efeito bifásico, que depende da sua concentração. Assim sendo, em concentrações baixas provoca disrupção da membrana celular, ao passo que em concentrações elevadas provoca a precipitação de proteínas e ácidos nucleicos (Barah, 2013).

1.7.1.3.2 Alexidina

A alexidina difere da clorexidina por ter uma ação bactericida mais rápida, promovendo mais rapidamente o aumento da permeabilidade da membrana celular. Este composto é usado como desinfetante nas soluções de lavagem oral e nas soluções usadas para preservar as lentes de contacto (Zorko & Jerala, 2008).

1.7.1.3.3 Biguanidas Poliméricas

As biguanidas poliméricas são biocidas catiónicos amplamente utilizados pois além de terem larga atividade antimicrobiana, apresentam baixo custo e baixa toxicidade. Opta-se por este composto em detrimento da clorexidina quando há necessidade de uso prolongado ou quando o tempo de contacto tem que ser maior. As biguanidas poliméricas também provocam disrupção celular, uma vez que se ligam aos grupos fosfato dos fosfolípidos da membrana celular. Assim alteram a sua permeabilidade e provocam a precipitação de compostos citoplasmáticos (Paula, Neto & Mattoso, 2011).

A biguanida polimérica mais utilizada é o vantocil, que tem ação contra bactérias Gram-negativas e positivas, não sendo esporocida (McDonell & Russel, 1999).

1.7.1.4 Compostos à base de halogénios

Dentro deste grupo, os agentes à base de cloro e iodo são os halogénios com atividade antimicrobiana mais relevante, sendo os mais usados como desinfetantes e antisépticos (McDonell & Russel, 1999).

1.7.1.4.1 Compostos à base de cloro

Os compostos à base de cloro mais utilizados são o hipoclorito de sódio, o dióxido de cloro e os compostos de N-cloro, como o dicloroisocianurato de sódio. As soluções de hipoclorito de sódio são usadas em produtos de desinfecção de superfícies domésticas, bem como o dicloroisocianurato de sódio, embora com este último as concentrações de cloro disponível sejam maiores e este seja menos suscetível de ser inativado por matéria orgânica (Barah, 2013).

Estes compostos têm várias ações, provocando a oxidação de aminoácidos, a perda de componentes intracelulares, diminuem a entrada de nutrientes e de oxigénio e provocam alterações no DNA e na sua síntese (Rutala *et al.*, 2008). Desta forma, inibem a atividade de enzimas essenciais à multiplicação, danificam moléculas e interferem com a capacidade de transporte da membrana celular (Fukuzaki, 2006).

Demonstram ainda atividade bactericida, esporocida (em concentrações elevadas) e virucida (McDonell & Russel, 1999).

1.7.1.4.2 Compostos à base de iodo

Os compostos à base de iodo incluem as soluções alcóolicas ou aquosas de iodo e os iodóforos (McDonell & Russel, 1999).

Estes compostos exercem ação contra bactérias, micobactérias, fungos, protozoários e numa grande variedade de vírus com e sem envelope (Sriwilaijaroen *et al.*, 2009).

As soluções alcóolicas ou aquosas de iodo são tóxicas para os tecidos e causam descoloração da pele, dores, irritação e inflamação. As soluções aquosas de iodo também são instáveis em solução (Angel, Morey, Storer & Mwipatayi, 2008).

Como alternativa, foram desenvolvidos os iodóforos, como a iodopovidona, que são complexos de iodo e de um agente solubilizante, que atua como um “reservatório” do iodo livre e permite a sua libertação em meio aquoso. Esta formulação permitiu combater os problemas colocados pela clássica tintura de iodo, que provocava irritação e manchas difíceis de remover. Apesar dos iodóforos preservarem a atividade antimicrobiana, são considerados menos eficazes contra certos fungos e esporos do que as tinturas de iodo (McDonell & Russel, 1999).

À semelhança do cloro, estes agentes exercem a sua ação antimicrobiana mesmo em baixas concentrações. Os agentes libertadores de iodo penetram na célula microbiana e atacam os grupos tiol das proteínas, seguindo-se a morte celular. O mecanismo de ação contra vírus está pouco esclarecido (Barah, 2013).

1.7.1.5 Compostos de Prata

Os principais compostos de prata com atividade antimicrobiana são a sulfadiazina de prata, acetato de prata, nitrato de prata e proteína de prata, sendo a sulfadiazina de prata o composto mais relevante (McDonell & Russel, 1999).

Estes compostos são usados na prevenção de infeções derivadas de queimaduras e infeções oculares. Também têm aplicações como conservantes em produtos farmacêuticos (Barah, 2013).

A ação antimicrobiana dos compostos de prata deve-se à interação dos iões de prata com os grupos tiol das proteínas e enzimas bacterianas, inativando-as. Além disso, também se depositam no interior das células microbianas, provocando alterações estruturais que inibem a divisão celular (Jung *et al.*, 2008). Outra ação é a interação com o DNA, inibindo a sua transcrição (Barah, 2013).

1.7.1.6 Peróxidos

1.7.1.6.1 Peróxido de Hidrogénio

O peróxido de hidrogénio é um biocida amplamente utilizado na desinfeção, esterilização e antisepsia. Uma vez que se degrada em produtos inócuos (água e oxigénio) é benéfico em termos ambientais (McDonell & Russel, 1999).

O peróxido de hidrogénio é eficaz contra bactérias e os seus esporos, vírus e fungos, sendo mais eficaz contra bactérias Gram-positivas do que negativas. A capacidade de algumas bactérias de produzir catalase pode diminuir a sua eficácia se for usado em baixas concentrações e, para garantir uma atividade esporocida eficaz, são necessários tempos de contacto e concentrações mais elevadas do composto (Barah, 2013).

O peróxido de hidrogénio atua como agente oxidante através da produção de radicais livres de hidroxil, que atacam componentes celulares como os lípidos, proteínas e DNA (Finnegan *et al.*, 2010).

1.7.1.6.2 Ácido Paracético

O ácido paracético é considerado um biocida mais potente do que o peróxido de hidrogénio, tendo ação esporocida, bactericida, virucida e fungicida em concentrações baixas. O seu uso principal é como desinfetante de efluentes de águas residuais (Barah, 2013).

As vantagens da utilização deste composto prendem-se com o facto de se decompor em produtos seguros (ácido acético e oxigénio) e de não sofrer a ação de peroxidases, ao contrário do peróxido de hidrogénio. Adicionalmente, é um produto que se mantém ativo na presença de grandes quantidades de matéria orgânica (McDonell & Russel, 1999).

No que diz respeito ao seu mecanismo de ação, ácido paracético desnatura enzimas e proteínas e aumenta a permeabilidade da membrana celular por disrupção de ligações dissulfídicas (McDonell & Russel, 1999).

1.7.1.7 Fenóis

Os fenóis são usados como antisépticos, desinfetantes ou conservantes, dependendo do composto. Os fenóis têm ação bactericida, virucida e fungicida (Rutala *et al.*, 2008). Neste grupo destacam-se os halofenóis e os bisfenóis (Barah, 2013).

Relativamente ao mecanismo de ação, em concentrações elevadas os fenóis penetram e provocam a disrupção da membrana celular e provocam a precipitação de proteínas (Rutala *et al.*, 2008). Em baixas concentrações provocam a morte da célula microbiana por expulsão progressiva de constituintes intracelulares essenciais através da membrana celular, incluindo a libertação de iões de potássio (Barah, 2013).

1.7.1.7.1 Halofenóis

O composto mais relevante neste grupo é o cloroxilenol, que é usado como desinfetante e antiséptico. O cloroxilenol é bactericida. No entanto, *P. aeruginosa* e alguns fungos são bastante resistentes. Devido à sua natureza fenólica, este composto exerce efeito nas membranas celulares (Barah, 2013).

1.7.1.7.2 Bisfenóis

O triclosan e o hexaclorofano são os biocidas mais utilizados neste grupo. Estes compostos exibem um espectro elevado de atividade, mas são praticamente ineficazes contra *P. aeruginosa* e fungos e são esporostáticos. O triclosan é particularmente ativo contra bactérias Gram positivas, ao passo que o seu efeito em bactérias Gram-negativas e fungos pode ser promovido através de combinações com outras substâncias, como é o caso do

ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) que aumenta a permeabilidade das membranas celulares (Barah, 2013).

Pensa-se que o triclosan tem ação sobretudo ao nível da membrana citoplasmática. Alguns estudos revelaram que em concentrações baixas, este composto inibe a captura de nutrientes essenciais pela célula, ao passo que em concentrações elevadas, promove a libertação de componentes celulares e a morte celular (McDonell & Russel, 1999).

No que diz respeito ao hexaclorofano o seu principal mecanismo de ação é inibir a cadeia transportadora de eletrões na membrana celular. Também promove a libertação de componentes celulares e inibe a respiração celular. O uso deste composto é limitado uma vez que tem efeitos tóxicos em neonatos (McDonell & Russel, 1999).

1.7.1.8 Agentes de superfície (surfactantes)

Os surfactantes possuem duas regiões na sua estrutura molecular, um grupo hidrofóbico (repelente da água) e um grupo hidrofílico (com afinidade à água). Os surfactantes são classificados como catiónicos, aniónicos, não-iónicos e anfotéricos (Barah, 2013). Os agentes catiónicos, onde se incluem os compostos de amónio quaternário, são os biocidas mais relevantes (McDonell & Russel, 1999).

1.7.1.8.1 Compostos de amónio quaternário

Os compostos de amónio quaternário são surfactantes catiónicos (detergentes) que reduzem a tensão da superfície e formam micelas, o que proporciona a sua dispersão em meio líquido. A baixa toxicidade dos compostos de amónio quaternário, aliada à facilidade em produzir formulações específicas, contribui para que sejam amplamente utilizados em áreas como a indústria alimentar e produtos de consumo, para limpeza, sanitização e desinfeção de superfícies (Gerba, 2015). Além disso, têm também aplicação em várias atividades clínicas, como a desinfeção da pele no pré-operatório, aplicação nas membranas mucosas e desinfeção de superfícies não críticas (McDonell & Russel, 1999).

McDonell & Russel (1999) propuseram a seguinte sequência de eventos no mecanismo de ação dos compostos de amónio quaternário:

- Adsorção e penetração do agente na parede celular;
- Reação do agente com a membrana citoplasmática (lípidos ou proteínas) seguida de desorganização da membrana;
- Saída de material intracelular de baixo peso molecular;
- Degradação de proteínas e ácidos nucleicos;

- Lise da parede celular provocada por enzimas autolíticas. Desta forma há a perda da organização estrutural e integridade da membrana citoplasmática da bactéria, em simultâneo com os outros efeitos nefastos no interior da célula.

Dentro dos compostos de amónio quaternário, o cloreto de benzalcónio é o mais utilizado atualmente. Este composto atua nas membranas celulares, alterando a sua permeabilidade. Em concentrações baixas, provoca a saída de material citoplasmático e promove a sua própria entrada para o interior da célula. Em concentrações altas, ataca grupos carboxílicos e provoca coagulação geral no citoplasma bacteriano (Fazlara & Ekhtelat, 2012).

A atividade hidrofóbica destes compostos contribui para que sejam eficazes contra vírus com envelope lipídico (Gerba, 2015). Em vírus sem envelope não são eficazes (McDonell & Russel, 1999). Em baixas concentrações (0,5 a 5 mg/L) são bacteriostáticos, tuberculostáticos, esporostáticos e fungistáticos. Em concentrações de 10 a 50 mg/L, são microbicidas para os mesmos grupos, dependendo dos microrganismos em causa e da formulação do produto (Gerba, 2015).

1.8 Mecanismos de resistência aos biocidas

Os mecanismos de resistência são meios que os organismos desenvolvem em resposta às constantes mudanças ambientais e que lhes permitem sobreviver. A resistência é definida como a insusceptibilidade relativa, viabilidade ou multiplicação de um microrganismo a um determinado tratamento químico, sob determinadas condições. Pode ser temporária ou permanente, e relativa à primeira geração de microrganismos ou à próxima (Araújo *et al.*, 2011).

As bactérias que se encontram na forma plantónica, são consideradas resistentes a um biocida se não forem inativadas por uma concentração específica ou período de exposição que normalmente inativa a maioria da espécie em questão. Já no caso das bactérias em biofilmes, a sua insuscetibilidade é considerada uma tolerância em vez de uma “resistência real”, visto que é induzida pela adaptação ao modo de vida em biofilme (com crescimento séssil, stress nutritivo e contacto repetitivo com concentrações sub-letais do biocida) e pode ser reduzida ou revertida quando as células voltam ao seu estado plantónico (Bridier, Briandeta, Thomasc & Dubois-Brissonnet, 2011).

Assim sendo, os tipo de resistência documentados são a resistência intrínseca ou natural e a resistência adquirida, devido à ocorrência de mutações e normalmente mediada por plasmídeos (Araújo *et al.*, 2011).

1.8.1 Mecanismos de Resistência Intrínseca

As bactérias variam na sua resistência intrínseca aos biocidas, sendo os esporos bacterianos considerados as formas mais resistentes, seguidos de *Mycobacterium* spp, bactérias Gram-negativas e sendo as bactérias Gram-positivas consideradas as mais susceptíveis (Barah, 2013).

Os principais mecanismos de resistência intrínseca são a impermeabilidade da parede celular, existência de bombas de efluxo ativas, formação de biofilmes e inativação enzimática dos biocidas (Barah, 2013).

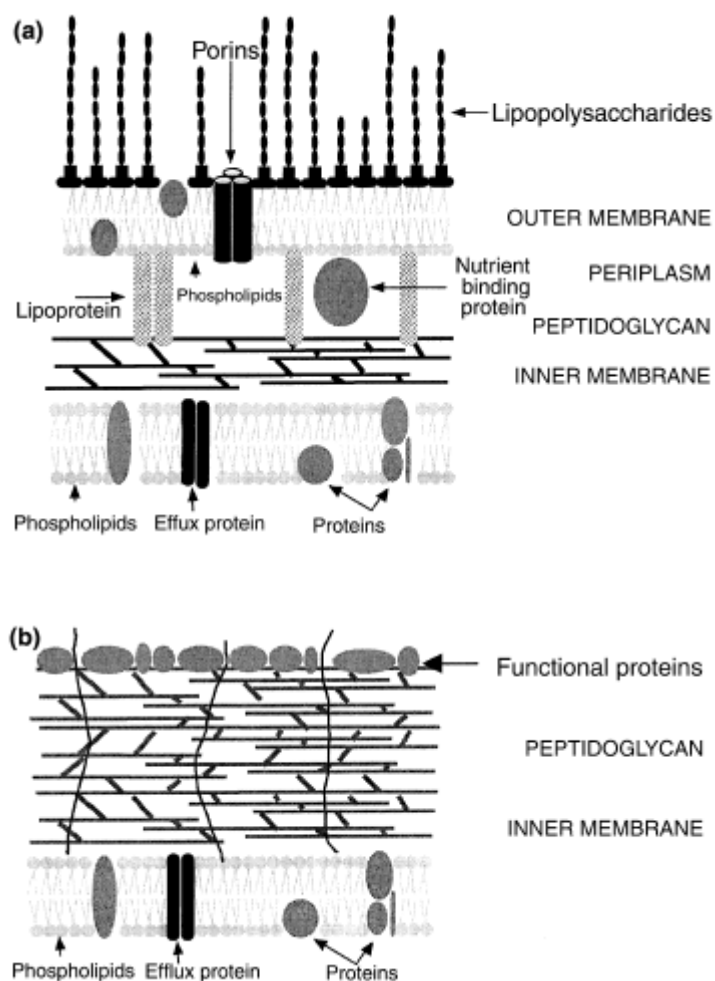
1.8.1.1 Impermeabilidade da parede celular

O fenómeno da impermeabilidade da parede celular é particularmente importante na resistência aos biocidas pelas micobactérias e pelas bactérias Gram-negativas devido às características das suas paredes celulares (Denyer & Maillard, 2002).

No caso das bactérias Gram-negativas, a parede celular é constituída por uma membrana externa (envelope), uma fina camada de peptidoglicanos e pelo espaço periplasmático, que separa a membrana externa da membrana citoplasmática. O envelope é constituído por lipopolissacarídeos (LPS), fosfolípidos e proteínas (em particular porinas) (Denyer & Maillard, 2002). Na Figura 1 é possível ver um esquema que representa a constituição da parede celular de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

Os LPS, em conjunto com os peptidoglicanos, são os principais responsáveis pela impermeabilidade da parede celular das bactérias Gram-negativas, constituindo uma barreira à entrada dos biocidas. As porinas são canais que controlam a entrada de moléculas para o interior da célula, sendo que quando sujeitas a stress, as bactérias gram-negativas têm a capacidade de diminuir o número de porinas à sua superfície, reduzindo assim a entrada de biocidas (Denyer & Maillard, 2002).

Figura 1: Representação esquemática da constituição das membranas celulares externas de bactérias Gram-negativas (a) e Gram-positivas (b) (Fonte: Denyer & Maillard, 2002).



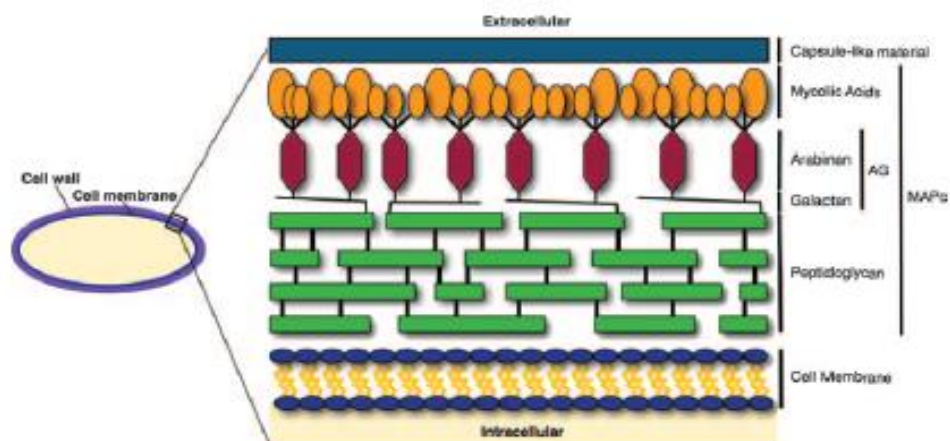
Por outro lado, as micobactérias possuem uma parede celular complexa rica em ácido micólico e lípidos, que lhe confere impermeabilidade a muitos biocidas (Silva & Palomino, 2011). Na figura 2 é possível ver a representação da constituição da parede celular de micobactérias.

Os esporos bacterianos também são mais resistentes que as suas formas vegetativas, devido à sua estrutura complexa. A célula germinativa é rodeada por um revestimento externo, o exosporo (nem sempre presente), uma cápsula externa e interna e pelo cortex. O cortex consiste sobretudo de peptidoglicanos e as cápsulas externa e interna são ricas em proteínas, e são estas estruturas que desempenham um papel importante como barreira à penetração de muitos biocidas (McDonell & Russel, 1999). Barah (2013) refere que a remoção experimental das cápsulas e do cortex levava a um aumento na suscetibilidade dos

esporos aos biocidas e que a estrutura dos esporos variava consoante as espécies, o que por sua vez leva à existência de diferentes graus de permeabilidade aos biocidas.

As bactérias Gram-positivas em geral têm um envelope celular permeável que não restringe a entrada de biocidas. Biocidas constituídos por moléculas pequenas como os álcoois, aldeídos e fenóis penetram sem dificuldade nestes microrganismos (Barah, 2013).

Figura 2: Representação esquemática da constituição da parede celular de micobactérias (Fonte: Hett & Rubin, 2008).



1.8.1.2 Bombas de efluxo

As barreiras descritas anteriormente não conseguem evitar que os biocidas exerçam a sua ação no caso de atingirem o espaço intracelular. Nestes casos, as bombas de efluxo desempenham um papel importante no estabelecimento de elevados níveis de resistência aos biocidas (Putman, Van Veen & Konings, 2000).

As bombas de efluxo são proteínas envolvidas na expulsão de substâncias tóxicas do interior das células. Estas bombas podem ser específicas para um substrato ou transportar uma vasta quantidade de compostos molecularmente distintos (incluindo antibióticos de diferentes classes). Essas bombas estão associadas à resistência múltipla a antibióticos (Webber & Piddock, 2003). Existem duas categorias principais de bombas de efluxo, as que dependem do ATP e as que funcionam por ação de bombas de prótons e existem numa grande variedade de estruturas, podendo consistir de uma proteína única que está envolvida no processo de efluxo ou sistemas constituídos por proteínas localizadas na membrana citoplasmática e porinas localizadas na membrana externa (Levy, 2002).

A utilização inadequada de biocidas pode favorecer a seleção de estirpes resistentes não só a um biocida, mas a vários tipos de biocidas e antibióticos, uma vez que grande parte das bombas de efluxo atuam contra várias classes de substâncias (Webber & Piddock, 2003).

Já se demonstrou a eficácia das bombas de efluxo contra vários biocidas, como é o caso dos compostos de amônio quaternário, biguanidas, fenóis e diamidina, embora os seus efeitos contra álcoois, aldeídos, peróxidos e compostos derivados do cloro ainda não estejam esclarecidos (Barah, 2013).

1.8.1.3 Transformação enzimática de biocidas

A resistência a biocidas pode surgir devido à transformação dos mesmos em compostos não tóxicos por ação de enzimas. Como exemplo, está descrita a resistência a metais pesados (mercúrios, cádmio, arsénio, zinco), em que a sua expulsão ocorre por redução enzimática do catião do metal, e a resistência aos aldeídos, devido à síntese de formaldeído desidrogenase (Cloete, 2003). Demple (1996), também descreveu a produção das enzimas catalase, super oxidase dismutase e alquil hidroperoxidases, que removem os radicais livres dos peróxidos.

1.8.2 Mecanismos de Resistência Adquiridos

Tal como sucede com antibióticos, a resistência adquirida a antisépticos e desinfetantes também pode surgir por mutação genética ou aquisição de material genético na forma de plasmídeos ou transposões (McDonell & Russel, 1999).

Os plasmídeos e transposões são elementos genéticos móveis que podem ser transferidos de uma bactéria para outra. Os plasmídeos bacterianos contêm um conjunto de genes que podem ser usados periodicamente pelas bactérias para ajudá-las a sobreviver em condições adversas, como genes que conferem resistência a antibióticos e biocidas, genes que codificam enzimas que otimizam a capacidade nutritiva da célula e fatores de virulência que ajudam a invadir outros organismos e genes que atuam na reparação do DNA. Existem plasmídeos que podem ser transferidos para um espectro largo de bactérias, ao passo que outros apenas se transferem entre um limitado número de estirpes bacterianas (Bennett, 2008).

Um exemplo de resistência mediada por plasmídeos é a demonstrada por *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* spp. e alguns elementos da família das enterobactérias aos compostos de amônio quaternário (Fraise, 2002). Adicionalmente, também se observou este tipo de resistência em relação a metais pesados e compostos de prata (McDonell & Russel, 1999).

Já as transposições consistem em conjuntos de genes que conseguem mover-se de um local para outro na mesma molécula de DNA, mover-se entre moléculas de DNA diferentes ou de um plasmídeo para outro, e são reponsáveis sobretudo pela transferência de genes que conferem resistência a antibióticos (Bennett, 2008).

No que diz respeito às mutações genéticas, existem poucos estudos em relação à sua influência na resistência aos biocidas, embora já se tenha observado este tipo de resistência em várias estirpes bacterianas aos compostos de amónio quaternário e à clorexidina. Também se observou que os isolados de bactérias Gram-negativas provenientes de hospitais (e outros ambientes) são menos sensíveis aos desinfetantes que os isolados de laboratório, sendo que a hipótese explicativa para este facto é a ocorrência de seleção e mutação de estirpes resistentes. Sabe-se que concentrações subinibitórias de antibióticos provocam este tipo de alterações. No entanto são necessários mais estudos para perceber a influência da exposição a concentrações residuais de biocidas (McDonell & Russel, 1999).

2. Biofilmes

2.1 A definição dos biofilmes

Os biofilmes são agregados de microrganismos que se encontram aderentes uns aos outros e/ou a uma superfície e cujas células se encontram incorporadas numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares (SPE), produzidas pelos próprios (Flemming *et al.*, 2016).

Uma característica distintiva dos biofilmes é a presença de uma matriz extremamente hidratada de SPE, composta por polissacarídeos, proteínas, lípidos e ácidos nucleicos, e que corresponde ao componente primário do biofilme, representando cerca de 50 a 90% da sua biomassa seca total (Billings, Birjiniuk, Samad, Doyle & Ribbeck, 2014).

A formação de biofilmes constitui um modo de vida alternativo no qual os microrganismos adotam comportamentos multicelulares que facilitam ou prolongam a sua sobrevivência em vários nichos ecológicos. Os biofilmes formam-se em várias superfícies bióticas e abióticas, quer no meio ambiente, quer nas indústrias e ambientes hospitalares (Kostakioti, Hadjifrangiskou & Hultgren, 2013).

A transição da forma de vida plasmática para biofilme ocorre em resposta a alterações ambientais e envolve a reprogramação genética, com alteração da expressão de moléculas de superfície, fatores de virulência e utilização de nutrientes, fornecendo às bactérias propriedades que proporcionam a sua sobrevivência em condições desfavoráveis (Kostakioti, Hadjifrangiskou & Hultgren, 2013).

A matriz extracelular constitui uma interface entre o biofilme e o meio ambiente, através da qual ocorrem as interações com o ambiente externo, além de conferir uma organização espacial ao biofilme que proporciona a existência de uma elevada biodiversidade e interações complexas, dinâmicas e sinérgicas, como a comunicação intercelular e a transferência horizontal de genes (Flemming *et al.*, 2016).

Deste modo, a matriz confere, benefícios estruturais e funcionais ao biofilme, tais como hidratação, captura de nutrientes, capacidade digestiva e proteção contra agentes antimicrobianos, além de facilitar interações intercelulares que melhoram a capacidade metabólica das células e a resistência dos biofilmes a agentes antimicrobianos (Flemming *et al.*, 2016).

2.2 Influência dos biofilmes na eficácia de biocidas

Os microrganismos podem ser protegidos dos desinfetantes através da produção de grandes massas celulares e materiais extracelulares, como os que são encontrados em biofilmes. Uma vez no interior de biofilmes, os microrganismos podem tornar-se resistentes aos biocidas através de vários mecanismos, como as características físicas dos biofilmes, alterações genóticas das bactérias, ou gradientes fisiológicos do biofilme (como o pH) (Rutala *et al.*, 2008).

Observou-se que as bactérias presentes em biofilmes têm uma maior resistência aos antimicrobianos do que as suas formas plantónicas (Mah & O'Toole, 2001).

Um dos fatores que contribui para essa resistência é a penetração limitada de agentes antimicrobianos nos biofilmes (Mah & O'Toole, 2001; Lewis, 2001; Bridier *et al.*, 2011; Flemming *et al.*, 2016). Os biofilmes são constituídos por uma matriz extracelular que corresponde a uma estrutura complexa e compacta e que atua como barreira, dificultando a penetração dos biocidas. Adicionalmente, os biocidas são na sua maioria moléculas altamente reativas que ao interagirem com os componentes de matéria orgânica presentes no biofilme, como as proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos, são neutralizadas e perdem a sua eficácia (Bridier *et al.*, 2011).

O ritmo de multiplicação lento no interior dos biofilmes também contribui para a sua resistência a agentes antimicrobianos (Mah & O'Toole, 2001; Lewis, 2001; Flemming *et al.*, 2016). Os biofilmes contêm um elevado número de células em fase estacionária de multiplicação, sendo que estas células apresentam suscetibilidade reduzida a muitos agentes antimicrobianos que dependem do metabolismo das células bacterianas para exercer a sua atividade (Flemming *et al.*, 2016). Praticamente todos os agentes antimicrobianos são mais eficazes em células de multiplicação rápida, sendo que alguns antibióticos como a penicilina e ampicilina, apenas exercem o seu efeito em células em multiplicação (Lewis, 2001).

Quando as bactérias se encontram em biofilme, estabelecem uma forma de comunicação intercelular baseada na densidade populacional, através de autoindutores, que correspondem a moléculas sinalizadoras. Este processo de comunicação designa-se por *quorum sensing* (Sifri, 2008). Ainda de acordo com Sifri (2008), graças ao *quorum sensing*, são induzidos comportamentos nas células microbianas que otimizam as suas atividades metabólicas em biofilmes e melhoram a sua sobrevivência. Entre estas atividades encontram-se a produção de substâncias poliméricas extracelulares, produção de enzimas que inativam agentes antimicrobianos e controlo da multiplicação microbiana (Irie & Parsek, 2008, Bridier *et al.*, 2011)

Lewis (2001), refere também que a resistência de biofilmes pode dever-se em parte à presença de células persistentes. As células persistentes são células que não se multiplicam nem são eliminadas na presença de agentes bactericidas e que exibem resistência múltipla a esses agentes (Lewis, 2005). Lewis (2005), demonstrou ainda que as células persistentes são responsáveis por infecções refratárias causadas por biofilmes bacterianos.

Por fim, as bactérias que se encontram incluídas num biofilme são ainda sujeitas a alterações do fenótipo em resposta às condições ambientais. Em resposta a factores de stress como a restrição de nutrientes, elevada densidade celular ou exposição a doses sub letais de biocidas, as bactérias sofrem modificações a nível da composição da membrana celular, com diminuição da permeabilidade, além de aumentarem a expressão dos genes que controlam as bombas de efluxo que expulsam as substâncias adversas (Mah & O'Toole, 2001).

2.3 Implicações da formação de biofilmes

A nível da indústria alimentar, os biofilmes que se formam em ambientes de processamento de alimentos são de particular importância uma vez têm o potencial de constituir uma fonte persistente de contaminação microbiana que dá origem à degradação dos alimentos e à transmissão de doenças (Houdt & Michiels, 2010).

Vários estudos descrevem a persistência de microrganismos patogénicos de origem alimentar em superfícies que contactam com alimentos, como é o caso de *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* e *Campylobacter jejuni*. Quando sujeitos a condições ideais, estes microrganismos aderem às superfícies e formam biofilmes indesejáveis. A principal causa de contaminação na indústria alimentar é a realização de uma limpeza e desinfeção inadequadas dos equipamentos e superfícies, com acumulação de microrganismos nesses locais e formação de biofilmes. A acumulação de microrganismos sob a forma de biofilmes leva à contaminação dos alimentos após o seu processamento, com diminuição do seu tempo de vida útil. A natureza dos materiais também influencia a adesão dos microrganismos, sendo esta favorecida por materiais como o teflon, vidro, polipropileno, aço inoxidável e borracha (Kumar & Anand, 1998).

No que diz respeito à saúde animal e humana, os biofilmes podem provocar doenças que estão relacionadas com a sua presença em dispositivos médicos, uma vez que constituem uma superfície para a deposição de bactérias. É o caso das válvulas cardíacas protéticas, próteses nas articulações, catéteres urinários e lentes de contacto. As doenças com origem em biofilmes também podem surgir devido a uma disfunção do sistema imunitário do paciente. Estas infecções são problemáticas, pois têm elevadas taxas de morbilidade e mortalidade, sendo o tratamento difícil e dispendioso. A dificuldade no tratamento deve-se

ao facto do sistema imunitário não estar adaptado a lidar com biofilmes (as células fagocíticas não conseguem ingerir as bactérias contidas nos biofilmes) e porque os microrganismos dos biofilmes são altamente resistentes aos agentes antimicrobianos (Wilson, 2001).

Apesar do ênfase conferido ao impacto negativo dos biofilmes na saúde humana e animal, é importante realçar que alguns biofilmes exercem um papel protetor importante. É o caso dos biofilmes compostos por *Lactobacillus* spp. presentes no aparelho reprodutor feminino que conferem proteção contra organismos patogénicos exógenos, uma vez que produzem ácidos, bacteriocinas, peróxido de hidrogénio e biosurfactantes. Outro biofilme benéfico é a placa dentária que se forma à superfície dos dentes e que também protege de organismos patogénicos exógenos. Apesar deste biofilme ser sobretudo constituído por *Actinomyces* spp. e *Streptococcus* spp., outros microrganismos podem estar presentes e, sob certas condições, esses microrganismos podem proliferar e dar origem a um biofilme incompatível com a saúde, dando origem a cáries, gengivites e periodontites (Wilson, 2001).

O impacto positivo dos biofilmes também se estende a nível industrial e ecológico. É possível recorrer a biofilmes para o tratamento de águas industriais, residuais e na descontaminação de áreas poluídas. Nestes processos, as águas contaminadas passam por filtros constituídos por biofilmes, que removem a matéria orgânica das águas. Muitos biofilmes têm ainda a capacidade de degradar fenóis, uma propriedade que é também aproveitada para o tratamento de águas (Vasudevan, 2014).

2.4 Estratégias de prevenção, controlo e eliminação de biofilmes

Os biofilmes são de difícil erradicação devido ao seu fenótipo resistente. Contudo, os métodos convencionais de limpeza e desinfecção, quando mal aplicados, também podem contribuir para um controlo ineficaz de biofilmes e para a disseminação da sua resistência. Atualmente novas estratégias de controlo estão a desenvolver-se, com particular ênfase em biossoluções (enzimas, fagos e moléculas antimicrobianas com origem bacteriana), contudo são alternativas que se encontram limitadas pelos preços elevados e pelo facto do conhecimento sobre os seus mecanismos de ação ainda não estarem esclarecidos (Simões, Simões & Vieira, 2010^a).

2.4.1 Prevenção e controle

Atualmente não existe nenhum método que previna eficazmente o aparecimento de biofilmes. A estratégia principal consiste na limpeza e desinfecção regular de superfícies de modo a evitar que as bactérias se lhes adiram firmemente (Simões, Simões & Vieira, 2010^a). A estrutura dos equipamentos também é extremamente importante, sendo que se deve optar por equipamentos que favoreçam o escoamento de produtos, minimizem a deposição dos resíduos e facilitem os processos de limpeza e desinfecção, reduzindo assim a adesão de bactérias (Houdt & Michiels, 2010).

Alternativamente, pode optar-se pela utilização de materiais com menor propensão para a formação de biofilmes, bem como no revestimento de materiais com produtos antimicrobianos ou na modificação das suas propriedades físico-químicas. Demonstrou-se, por exemplo, que a utilização de implantes médicos revestidos com compostos de amónio quaternário teve como efeito uma diminuição na taxa de infeções pós operatórias (Simões, Simões & Vieira, 2010^a). Também se comprovou que o revestimento de aço inoxidável com polietilenoglicol reduzia a adesão de *Listeria monocytogenes* (Houdt & Michiels, 2010). A nível industrial, estes princípios também poderiam ser aplicados aos materiais com maior propensão para a formação de biofilmes. Contudo, a preocupação levantada pela utilização de produtos antimicrobianos na indústria alimentar constitui uma séria restrição a este método (Simões, Simões & Vieira, 2010^a).

2.4.2 Eliminação de biofilmes

2.4.2.1 Limpeza

A nível industrial, as operações de limpeza e desinfecção têm uma influência crucial na qualidade do produto final. A limpeza é o passo mais importante na prevenção de biofilmes, uma vez que, se este processo for ineficaz, os restos de alimentos e resíduos que contêm microrganismos e promovem o seu desenvolvimento não são removidos, formando-se biofilmes (Simões, Simões & Vieira, 2010^a). Na presença destes resíduos os desinfetantes são menos eficazes e a sua capacidade de penetração nos biofilmes reduz-se drasticamente (Houdt & Michiels, 2010).

Os produtos mais frequentemente utilizados para a limpeza são surfactantes ou produtos alcalinos, que suspendem e dissolvem resíduos alimentares através da redução da tensão superficial, emulsão de lípidos e desnaturação de proteínas (Simões, Simões & Vieira, 2010^a).

As ações mecânicas de limpeza, como a utilização de água sob pressão, contribuem para a maior eficácia da limpeza. Para que a limpeza seja eficaz, o processo deve destruir as

substâncias poliméricas extracelulares (SPE) associadas aos biofilmes, para que os desinfetantes consigam penetrar e exercer a sua ação (Simões, Simões & Vieira, 2010^a).

2.4.2.2 Desinfecção

A limpeza pode remover cerca de 90% ou mais de microrganismos associados à superfície, mas não é totalmente eficaz, uma vez que as bactérias podem depositar-se em outras localizações e formar biofilmes. Assim, há necessidade de usar desinfetantes (Cloete *et al.*, 1998).

A desinfecção é a utilização de produtos antimicrobianos com o objetivo de eliminar os microrganismos, reduzindo a população de células viáveis presentes na superfície que sobrevivem à ação de limpeza e prevenindo o crescimento microbiano antes que a produção seja retomada. Os desinfetantes são mais eficazes na ausência de material orgânico (gordura, carboidratos e proteínas) (Simões, Simões & Vieira, 2010^a).

Pode optar-se pela utilização de desinfetantes químicos, que são bactericidas e despolimerizam as SPE, facilitando a desagregação dos biofilmes das superfícies. É o caso dos agentes oxidantes como o ácido paracético, o cloro, o iodo e o peróxido de hidrogénio (Kumar & Anand, 1998). É importante realçar também que a eficácia de um desinfetante em células plantónicas pode não ser a mesma que em células associadas a biofilmes. Também está descrita a utilização de ozono, uma molécula com fortes propriedades oxidantes, que além de apresentar eficácia contra um espectro maior de bactérias em comparação com os desinfetantes químicos clássicos, pode ser usado em bactérias plantónicas e em biofilmes. Em alternativa, existem também os métodos físicos, como é o caso da radiação ionizante, que apresenta a mesma eficácia contra células plantónicas e células presentes em biofilmes, com a vantagem de poder ser usada numa grande variedade de alimentos e superfícies de contacto (Houdt & Michiels, 2010).

II- Trabalho Experimental

1. Objetivos

Este trabalho experimental foi realizado com o objetivo de avaliar a eficácia do biocida cloreto de benzalcônio, através da determinação de concentrações mínimas bactericidas (CMB) dos seguintes isolados bacterianos: *Staphylococcus* spp. LIS 7-S, *Salmonella* Typhimurium LIS-5, *Pseudomonas aeruginosa* LIS-1P, *Bacillus cereus* ATCC 11778 e *Escherichia coli* ATCC. O trabalho experimental foi dividido em quatro fases. Assim, os objetivos foram os seguintes:

1ª fase:

-Determinar quais as concentrações mínimas inibitórias (CMI) do biocida na forma plantônica de cada um dos 5 isolados bacterianos

2ª fase:

-Determinar quais as concentrações mínimas bactericidas (CMB) dos 5 isolados bacterianos em biofilmes multiespécie

3ª fase:

-Determinar quais as CMB de 3 isolados bacterianos resistentes em biofilmes constituídos por dois isolados bacterianos

4ª fase:

- Determinar quais as CMB de 3 isolados bacterianos resistentes em biofilmes constituídos por um isolado bacteriano

2. Materiais e métodos

2.1 Seleção, purificação e isolamento das bactérias produtoras de biofilmes

Para a realização deste trabalho experimental selecionaram-se os isolados bacterianos mais usados nos protocolos de avaliação de eficácia de biocidas, além de serem os isolados cuja formação de biofilmes é mais problemática em termos de saúde pública.

Assim sendo, foram selecionados os seguintes isolados bacterianos, disponibilizadas pelo laboratório de Microbiologia Alimentar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (Figura 3):

- *Staphylococcus* spp. LIS 7-S, isolado de fossas nasais de ovino saudável;
- *Salmonella* Typhimurium LIS-5, isolado do intestino de bovino saudável;
- *Pseudomonas aeruginosa* LIS-1P, isolado de canídeo com otite externa;
- *Bacillus cereus*, estirpe de referência ATCC 11778;
- *Escherichia coli*, estirpe de referência ATCC 25922 de coleção americana (Amp^r).

Figura 3: Isolados bacterianos selecionados para a realização do trabalho experimental : *Staphylococcus* spp. LIS 7-S, *S. typhimurium* LIS-5, *P. aeruginosa* LIS-1P, *B. cereus* ATCC 11778 e *E.coli* ATCC 25922



Para obter cada isolado, procedeu-se à sua sementeira num meio de cultura que proporcionasse o seu desenvolvimento. Para tal, foram produzidos meios sólidos em caixas de Petri e cada espécie foi semeada com ansa, por estria, em quatro caixas de Petri com o meio específico correspondente. A sementeira de *Staphylococcus* spp. LIS 7-S foi feita em Baird-Parker agar (Biokar Diagnostics, Allonne, Beauvais), a sementeira de *S. Typhimurium* LIS-5 foi feita em Hektoen-agar (Biokar Diagnostics, Allonne, Beauvais), a sementeira de *P.*

aeruginosa LIS-1P foi feita em Cetrimid-agar (Diagnostica Merck, Darmstadt), a sementeira de *B. cereus* ATCC 11778 foi feita em Plate Count-agar (PCA) (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England) e a sementeira de *E. coli* ATCC 25922 foi feita em Tryptone Bile X-Glucuronide (TBX)-agar (Biokar Diagnostics, Allonne, Beauvais). Os resultados em meio PCA eram confirmados com coloração Gram, de modo a garantir que era o isolado de *Bacillus cereus* se encontrava presente. Depois da sementeira, as caixas de Petri foram colocadas em estufa a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, procedeu-se ao isolamento dos isolados em cerca de 2 mL de meio PCA sólido contido em tubos eppendorf, por picagem, com ansa, das colónias obtidas nas caixas de Petri, de modo a conservar as estirpes e a garantir que estas não seriam contaminadas ao longo de todo o trabalho experimental. Os isolados obtidos foram posteriormente armazenados à temperatura ambiente ao longo de todo procedimento experimental. Eventualmente foi necessário proceder à revivificação dos isolados, e para tal, procedeu-se do mesmo modo. Contudo, o isolamento foi depois feito em tubos de conservação contendo meio de glicerol.

2.2 Determinação da susceptibilidade a antibióticos dos isolados bacterianos selecionados

A suscetibilidade a antibióticos de cada isolado bacteriano foi estudada através do método por difusão em discos. Este método foi realizado de acordo com os procedimentos recomendados pela Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), tendo os resultados obtidos sido interpretados de acordo com os critérios clínicos estabelecidos por essa entidade.

Assim sendo, em primeiro lugar, foram produzidos 100 mL do meio Müller-Hinton-agar (Biokar Diagnostics, Allonne, Beauvais), que foram distribuídos por 5 placas de Petri. A partir dos isolados de cada espécie, fizeram-se 5 suspensões em soluto fisiológico esterilizado até se obter uma densidade ótica de 0,5 na escala de McFarland. A partir destas suspensões, fez-se a sementeira com zaragatoa nas placas com o meio de Müller-Hinton, foram colocados os discos de antibióticos.

No que diz respeito aos antibióticos utilizados, seleccionaram-se antibióticos de vários grupos, em relação aos quais era expectável haver resistência ou sensibilidade da parte de cada isolado bacteriano, para posteriormente observar se a exposição ao biocida alterava a sensibilidade de cada isolado a esses antibióticos.

Assim sendo, para os isolados de bactérias Gram-negativas (*S. Typhimurium*, *P. aeruginosa* e *E. coli*) utilizaram-se os seguintes discos de antibióticos: ampicilina (Amp) 10 µg (Becton-Dickinson and Company, USA), cefotaxime (CTX-3) 30 µg (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England), cloranfenicol (CHL) 30 µg (Bio Rad, Marnes-La-

Coquette, France), ácido nalidíxico (Na) 30 µg (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England) e oxitetraciclina (OT) 30 µg (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England). Para os isolados de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus* spp. e *B.cereus*) foram usados os seguintes antibióticos: ampicilina (Amp) 10 µg , penicilina G (P) 10 U.I (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England), sulfametoxazol+trimetropim (SXT) 25 µg (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England) e oxitetraciclina (OT) 30 µg. Após a colocação dos discos de antibióticos nas placas, estas foram colocadas na estufa a 37°C durante 24 horas. Decorrido esse período, procedeu-se à medição do diâmetro da zona de inibição de crescimento em milímetros (mm) e os valores obtidos foram comparados com os valores tabelados pela entidade CLSI.

2.3 Estudo da eficácia do biocida cloreto de benzalcónio

2.3.1 Determinação da concentração mínima inibitória de cloreto de benzalcónio dos cinco isolados bacterianos em suspensão

Os compostos de amónio quaternário como o cloreto de benzalcónio são extensivamente utilizados na indústria alimentar e em ambientes hospitalares (Dutta, Elhanafi & Kathariou, 2013). Assim sendo, optou-se por utilizar ao longo de toda a experiência o biocida Suma Bac D10[®] (Johnson-Diversey) , constituído por cloreto de benzalcónio na concentração de 7%.

No primeiro ensaio realizado, pretendeu-se determinar qual a concentração mínima inibitória do biocida em estudo para cada isolado bacteriano em suspensão. Testaram-se as concentrações de 5, 4, 3, 2, 1, 0,8, 0,6 e 0,5 µg/mL do biocida nas 5 espécies bacterianas. Para a obtenção dessas concentrações, procederam-se a várias diluições decimais seriadas da substância ativa em caldo nutritivo Nutrient-Broth (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England), suplementado com 2% de glucose. Colocou-se 10mL de solução em cada tubo, obtendo-se um total de 40 tubos de ensaio (8 tubos de ensaio correspondentes às 8 concentrações diferentes, usados para cada um dos 5 isolados).

De cada um dos isolados, foi feita uma suspensão em caldo nutritivo. Introduziu-se 5 mL de caldo nutritivo num tubo de ensaio e semeou-se cada um dos isolados no caldo. Obtiveram-se assim 5 suspensões correspondentes a cada isolado. A partir destas 5 suspensões, inoculou-se 10 µL em cada tubo de ensaio contendo as diferentes concentrações da substância ativa. Após este procedimento, as amostras foram sujeitas a incubação a 37° durante 24 h. As cinco suspensões iniciais serviram ainda como amostra-testemunha positiva. A interpretação dos resultados foi visual, considerando-se que havia

desenvolvimento bacteriano (resultado positivo) no caso da solução no tubo de ensaio adquirir turvação após incubação.

Decorrido este período, não foi possível determinar a CMI para a espécie de *P. aeruginosa*, visto que esta se desenvolveu em todas as concentrações testadas. Assim sendo, foi necessário usar concentrações mais elevadas do biocida para esta espécie, sendo que se testaram as concentrações de 6, 7, 8, 9 e 10 µg/mL. Já no caso das espécies de *B. cereus* e *Staphylococcus* spp., também não foi possível determinar as suas CMI a partir das concentrações inicialmente testadas, visto que estes isolados não cresceram em nenhuma dessas concentrações. Foi então necessário usar concentrações mais baixas do biocida, sendo que se testaram as concentrações de 0,4, 0,3, 0,2 e 0,1 µg/mL. Os procedimentos para a obtenção dessas concentrações do biocida e para a sementeira das estirpes foram os mesmos descritos anteriormente.

2.3.2 Determinação da concentração mínima bactericida de cloreto de benzalcónio para os 5 isolados bacterianos em biofilmes multiespécies (constituídos pelos 5 isolados em estudo)

A metodologia adotada para estudar a eficácia do biocida em biofilmes baseou-se em algumas recomendações dadas para o efeito pela *American Society for Testing and Materials* (ASTM, 2012). No Anexo I é possível consultar o protocolo no qual se baseou o presente trabalho experimental para avaliar a eficácia do biocida em biofilmes, sendo que se adotaram alguns dos procedimentos aí referidos.

Ao longo do trabalho experimental, os biofilmes foram sujeitos a várias concentrações do biocida, bem como a tempos de ação diferentes. A metodologia de produção dos biofilmes e das soluções contendo o biocida foi sempre a mesma e será descrita de seguida.

2.3.2.1 Produção de biofilmes

Para a obtenção dos biofilmes constituídos pelos 5 isolados bacterianos, a partir dos isolados iniciais fez-se uma única suspensão em caldo nutritivo Nutrient-Broth num tubo de ensaio contendo os 5 isolados bacterianos. Recorrendo a uma ansa, procedeu-se à picagem das colónias contidas nos tubos eppendorf e semeou-se em 10 mL de Nutrient-Broth, num tubo de ensaio. Essa suspensão foi depois homogenizada até se obter uma densidade ótica de 0,5 na escala de McFarland e, de seguida, inoculou-se, com recurso a micropipeta, 10 µL da suspensão em tubos de ensaio que continham 5mL de caldo nutritivo. Os tubos de ensaio foram depois colocados a incubar a 37°C durante 48 horas. No caso dos biofilmes

ainda não apresentarem a consistência pretendida, que era avaliada por observação visual, optava-se por prolongar o tempo de incubação.

Os biofilmes constituídos por um e por dois isolados bacterianos foram obtidos do mesmo modo, recorrendo aos isolados iniciais.

2.3.2.2 Estudo da eficácia do biocida nos biofilmes

Após o desenvolvimento dos biofilmes em Nutrient-Broth, contidos em tubos de ensaio, o meio de cultura foi cuidadosamente removido, preservando apenas a película de biofilme aderente ao tubo de ensaio. De seguida, adicionou-se 5 mL de solução contendo o biocida na concentração pretendida, garantido que todo o biofilme se encontrava imerso pela solução. Para obtenção das várias concentrações do biocida em estudo, foram feitas diluições decimais seriadas.

Após a adição aos biofilmes da solução contendo o biocida, estes foram colocados a incubar a 37°C durante 30 minutos, 2 horas e 24 horas. Decorridos esses tempos, as suspensões foram cuidadosamente removidas dos tubos de ensaio, tendo o cuidado de manter preservado o biofilme. Adicionou-se novamente caldo nutritivo, que atuou como solução neutralizante, e procedeu-se à sementeira de cada uma das espécies bacterianas provenientes dos biofilmes multiespécies em caixas de Petri com os meios próprios de pesquisa de cada microrganismo. A sementeira foi feita recorrendo a uma ansa de plástico descartável com 1 µL de capacidade (Starstedt, Germany). Assim, procedeu-se à remoção cuidadosa das células do biofilme com a ansa, e fez-se a sementeira em Hektoen-agar para detetar a presença do isolado de *S. Typhimurium*, Cetrimid-agar para detetar a presença do isolado de *P. aeruginosa*, Baird-Parker agar para detetar a presença do isolado de *Staphylococcus* spp., PCA-agar para detetar a presença do isolado de *B. cereus* e TBX-agar para detetar a presença do isolado de *E. coli*. O isolado de *B. cereus* foi semeado em meio PCA uma vez que neste meio, as colónias de *B. cereus* têm uma morfologia macroscópica típica: são planas, opacas, grandes, rugosas, de bordos irregulares e facilmente distinguíveis dos outros isolados. Após a sementeira, as caixas de Petri foram colocadas a incubar a 37°C durante 24 horas. Considerou-se que o biocida tinha efeito bactericida numa espécie bacteriana quando esta não se desenvolvia no seu meio. O efeito do biocida em biofilmes contendo as 5 espécies bacterianas foi testado nas concentrações de 2, 6, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 µg/mL.

2.3.2.2.1 Ensaios a 2, 6, 10 e 15 µg/mL

Cada concentração foi testada numa semana diferente e aqui os métodos de produção dos biofilmes, bem como da obtenção das concentrações pretendidas do biocida foram iguais aos descritos. Em cada ensaio produziram-se 4 biofilmes de modo a testar o efeito do biocida nas concentrações pretendidas aos 30 minutos, 2 horas e 24 horas, com uma amostra-testemunha. Depois da obtenção dos biofilmes, o meio de cultura era cuidadosamente removido e adicionava-se a solução contendo o biocida com a concentração pretendida. Decorridos esses tempos, a solução com o biocida era cuidadosamente removida de cada tubo de ensaio, sendo substituída por caldo nutritivo e procedia-se à sementeira em caixas de Petri, nos mesmos meios já referidos e segundo o procedimento já descrito. Após as sementeiras, todas as placas eram incubadas a 37°C durante 24 horas.

2.3.2.2.2 Ensaios a 16, 17, 18, 19 e 20 µg/mL

Estas concentrações foram testadas em simultâneo. Foi testado o efeito do biocida nestas concentrações às 2 horas e às 24 horas de ação. A produção de biofilmes e a obtenção de suspensões com as concentrações pretendidas de biocida decorreu conforme os procedimentos já descritos.

2.3.2.2.3 Ensaio a 30, 40, 50 e 100 µg/mL

Estas concentrações foram testadas em simultâneo. Foi testado o efeito do biocida apenas às 24 horas de ação. A produção de biofilmes e a obtenção de suspensões com as concentrações pretendidas de biocida decorreu conforme os procedimentos já descritos.

2.3.3 Determinação da concentração mínima bactericida de cloreto de benzalcônio dos 3 isolados bacterianos mais resistentes ao biocida, em biofilmes constituídos por dois isolados bacterianos

Da etapa anterior do presente procedimento experimental, obtiveram-se 3 isolados bacterianos resistentes à ação do biocida cloreto de benzalcônio, nomeadamente os isolados de *P. aeruginosa*, de *E. coli* e de *S. Typhimurium*. Assim sendo, decidiu-se testar o efeito do biocida em biofilmes constituídos por conjuntos de dois dos isolados bacterianos referidos, de modo a tentar perceber a influência de um isolado sobre o outro. Utilizaram-se várias concentrações entre as CMI e as CMB obtidas para cada um dos 3 isolados de modo a observar se essas concentrações se mantinham na presença de outro isolado. Assim sendo, produziram-se três biofilmes:

- Biofilme constituído pelos isolados de *P. aeruginosa* e *E. coli*, e o biocida foi testado nas concentrações de 5, 10, 15 e 20 µg/mL.
- Biofilme constituído pelos isolados de *P. aeruginosa* e *S. Typhimurium*, e o biocida foi testado nas concentrações de 5, 10, 15 e 20 µg/mL
- Biofilme constituído pelos isolados de *S. Typhimurium* e *E. coli*, e o biocida foi testado nas concentrações de se 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL e 15 µg/mL

Para obter cada um destes biofilmes, fizeram-se três suspensões em caldo nutritivo. Em cada uma destas suspensões semearam-se, a partir dos isolados originais, os microrganismos pretendidos recorrendo a uma ansa descartável de 1 µL. A partir de cada suspensão, semeou-se 10 µL em 4 tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo nutritivo e esses tubos foram colocados a incubar durante 48 horas a 37°C. Assim, a partir de cada um dos 3 biofilmes diferentes, foram testadas 4 concentrações. Uma vez formados os biofilmes, procederam-se a várias diluições decimais para obter as concentrações pretendidas. De cada um dos tubos, foi removido cuidadosamente o caldo nutritivo de forma a manter o biofilme e introduziu-se 10 mL da solução com o desinfetante na concentração pretendida, com recurso a pipeta volumétrica. Os efeitos do biocida foram testados ao fim de 24 horas. No final deste período, a solução com desinfetante foi removida cuidadosamente de cada tubo de ensaio e foi substituída por caldo nutritivo. Procedeu-se a várias sementeiras, com recurso a ansa descartável:

- A sementeira a partir do biofilme constituído pelos isolados de *P. aeruginosa* e *E. coli* foi feita em meio cetrimid-agar e TBX-agar
- A sementeira a partir do biofilme constituído pelos isolados de *P. aeruginosa* e *S. Typhimurium* foi feita em cetrimid-agar e Hektoen-agar

- A sementeira a partir do biofilme constituído pelas espécies de *S. Typhimurium* e *E. coli* foi feita em Hektoen-agar e TBX-agar

Após as sementeiras, as caixas de Petri foram colocadas a incubar a 37°C durante 24 horas

2.3.4 Determinação da concentração mínima bactericida de cloreto de benzalcónio dos 3 isolados bacterianos resistentes em biofilmes constituídos por um isolado bacteriano

Nesta fase final, o objetivo foi testar o efeito do biocida em biofilmes constituídos apenas por cada um dos isolados bacterianos resistentes ao biocida, nomeadamente o isolado de *P.aeruginosa*, o isolado de *E. coli* e o isolado de *S. Typhimurium*. Assim sendo, fizeram-se três biofilmes:

- Biofilme constituído pelo isolado de *P. aeruginosa*, e o biocida foi testado nas concentrações de 15, 16, 17, 18, 19 e 20 µg/mL
- Biofilme constituído pelo isolado de *S. Typhimurium* e o biocida foi testado nas concentrações de 1, 2, 3, 4 e 5 µg/mL
- Biofilme constituído pelo isolado de *E. coli* e o biocida foi testado nas concentrações de 20, 21, 22, 23, 24 e 25 µg/mL

Para fazer os biofilmes, a partir dos isolados iniciais, fez-se uma suspensão para cada um num tubo de ensaio contendo caldo nutritivo. A partir dessas suspensões, foram semeados 10 µL em 6 tubos de ensaio contendo caldo nutritivo no caso dos isolados de *P. aeruginosa* e *E. coli* e 5 tubos de ensaio para *S. Typhimurium*. Estas suspensões foram deixadas a incubar durante 48 horas a 37°C.

Decorrido este período, foram feitas várias diluições decimais seriadas em tubos McCartney para se obter as concentrações pretendidas do biocida. De cada um tubos tubos de ensaio contendo os biofilmes, foi removido cuidadosamente o meio de cultura, deixando preservado o biofilme. Com uma micropipeta procedeu-se à colocação das várias soluções contendo concentrações diferentes do biocida nos respetivos tubos de ensaio. Estes foram colocados na estufa a 37°C durante 24 horas Após este período, foram feitas sementeiras nos meios respetivos para pesquisa de cada microrganismo para observar se houve crescimento.

3. Resultados e discussão

3.1 Sensibilidade a antibióticos dos isolados bacterianos selecionados

Seguidamente apresentam-se os resultados obtidos nos antibiogramas realizados para os 5 isolados bacterianos. Os resultados obtidos foram interpretados de acordo com os critérios estabelecidos pela entidade CLSI (2015).

3.1.1 Bactérias Gram-negativas

Os resultados dos antibiogramas realizados para *E. coli*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* estão representados na Tabela 1.

Tabela 1: Resultados obtidos do antibiograma realizado para os isolados de *E. coli*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa*

Substância Ativa	Espécie bacteriana	Diâmetro da zona de inibição de crescimento (mm)	Critérios Estabelecidos (mm)		Interpretação
			Sensível ≥	Resistente ≤	
Ampicilina	<i>Escherichia coli</i>	0	17	13	Resistente
	<i>Salmonella typhimurium</i>	22	17	13	Sensível
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	24	15	Resistente
Cefotaxime	<i>Escherichia coli</i>	35	21	17	Sensível
	<i>Salmonella typhimurium</i>	31	21	17	Sensível
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14	18	14	Resistente
Cloranfenicol	<i>Escherichia coli</i>	30	18	12	Sensível
	<i>Salmonella typhimurium</i>	27	18	12	Sensível
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	18	12	Resistente
Oxitetraciclina	<i>Escherichia coli</i>	28	15	11	Sensível
	<i>Salmonella typhimurium</i>	23	15	11	Sensível
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	19	14	Resistente
Ácido Nalidíxico	<i>Escherichia coli</i>	26	23	16	Sensível
	<i>Salmonella typhimurium</i>	23	23	16	Sensível
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	23	16	Resistente

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 1), o isolado de *E. coli* foi sensível ao cefotaxime, cloranfenicol, oxitetraciclina, ácido nalidíxico e resistente à ampicilina. O isolado de *S. Typhimurium* foi sensível a todos os antibióticos testados. O isolado de *P. aeruginosa* foi resistente a todos os antibióticos testados.

3.1.2 Bactérias Gram-positivas

Os resultados dos antibiogramas realizados para *B. cereus* e *Staphylococcus* spp. estão representados na Tabela 2.

Tabela 2: Resultados obtidos do antibiograma realizado para os isolados de *B. cereus* e *Staphylococcus* spp.

Substância Activa	Espécie bacteriana	Diâmetro zona de inibição de crescimento (mm)	Critérios Estabelecidos (mm)		Interpretação
			Sensível (\geq)	Resistente (\leq)	
Ampicilina	<i>Bacillus Cereus</i> ^a	0	29	28	Resistente
	<i>Staphylococcus</i> spp.	31	29	28	Sensível
Cefotaxime	<i>Bacillus Cereus</i> ^a	14	22	21	Resistente
	<i>Staphylococcus</i> spp.	28	22	21	Sensível
Sulfametoxazol+trimetropim	<i>Bacillus Cereus</i> ^a	0	16	10	Resistente
	<i>Staphylococcus</i> spp.	33	16	10	Sensível
Oxitetraciclina	<i>Bacillus Cereus</i> ^a	31	23	17	Sensível
	<i>Staphylococcus</i> spp.	34	23	17	Sensível
Penicilina G	<i>Bacillus Cereus</i> ^a	0	29	29	Resistente
	<i>Staphylococcus</i> spp.	34	29	28	Sensível

a: Usaram-se os valores estabelecidos para *Staphylococcus* spp.

No caso do isolado de *B. cereus* não se encontraram critérios estabelecidos para os antibióticos testados. Como tal, usaram-se os valores estabelecidos para *Staphylococcus* spp. De acordo com os resultados obtidos, *B. cereus* foi resistente a todos os antibióticos testados, à exceção da oxitetraciclina (Tabela 2). O isolado de *Staphylococcus* spp., foi sensível a todos os antibióticos testados (Tabela 2).

3.2 Determinação de concentrações mínimas inibitórias de cloreto de benzalcônio para cada isolado bacteriano na sua forma plantônica

Os resultados obtidos nesta etapa do procedimento experimental foram interpretados visualmente com base na turvação do conteúdo dos tubos de ensaio, sendo que a turvação é indicativa de desenvolvimento microbiano. A tabela 3 indica as concentrações mínimas inibitórias obtidas para cada isolado bacteriano.

Tabela 3: Concentrações mínimas inibitórias obtidas para cada isolado bacteriano

Isolado	Concentração mínima inibitória (µg/mL)
<i>Escherichia coli</i>	1
<i>Salmonella Typhimurium</i>	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
<i>Bacillus cereus</i>	0,2
<i>Staphylococcus spp.</i>	0,2

As concentrações de cloreto de benzalcônio testadas foram 5, 4, 3, 2, 1, 0,8 , 0,6 e 0,5 µg/mL para todos os isolados bacterianos. No caso dos isolados de *E. coli* e *S. typhimurium*, estes apenas se desenvolveram a 0,8 µg/mL, 0,6 µg/mL e 0,5 µg/mL. Para estes dois isolados bacterianas, definiu-se 1 µg/mL como sendo a sua CMI (Tabela 3). No caso do isolado de *P. aeruginosa*, este cresceu em todas as concentrações entre 0,5 µg/mL e 5 µg/mL. Testaram-se então concentrações mais elevadas entre os 6 µg/mL e 10 µg/mL, observando-se que este isolado não se desenvolveu a partir de 6 µg/mL e restantes concentrações. Definiu-se então 6 µg/mL como a CMI para *P. aeruginosa* (Tabela 3).

B. cereus e *Staphylococcus spp.* não se desenvolveram em nenhuma das concentrações testadas inicialmente. Testaram-se então concentrações mais baixas de biocida: 0,1 , 0,2, 0,3 e 0,4 µg/mL, verificando-se que ambos os isolados apenas se desenvolveram a 0,1 µg/mL. Definiu-se então 0,2 µg/mL como a CMI para *B. cereus* e *Staphylococcus spp.* (Tabela 3).

A concentração mínima inibitória (CMI) é definida como a concentração mais baixa de antimicrobiano que inibe o crescimento visível de um microrganismo, após um determinado período de incubação, caracterizada pela ausência de turvação de uma suspensão bacteriana (Zarakolu, Çöplü, Arslantürk, Levent & Güvener, 1999; Andrews, 2001).

Nesta fase do trabalho experimental procedeu-se à determinação da CMI para cada isolado bacteriano (Tabela 3), uma vez que a interpretação do resultado baseou-se na observação da presença ou ausência de turvação das suspensões bacterianas. Alguns autores também consideram que a CMI o parâmetro de eleição na avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos de bactérias na sua forma plantónica (Sepandj, Ceri, Gibb, Read & Olson, 2004).

Os resultados obtidos determinam que as bactérias Gram-positivas (isolados de *B. cereus* e *Staphylococcus spp*) são mais sensíveis à ação do cloreto de benzalcónio do que as bactérias Gram-negativas (isolados de *E. coli*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa*), visto que as CMI obtidas para as Gram-positivas foram inferiores. Já vários autores afirmaram que os compostos de amónio quaternário e neste caso, o cloreto de benzalcónio, são mais eficazes contra bactérias Gram-positivas do que negativas (To, Favrin, Romanova & Griffiths, 2002; Kahjavi, Sattari & Ashjarian, 2007), facto sustentado por experiências nas quais se obtiveram valores de CMI e de CMB de cloreto de benzalcónio inferiores para bactérias Gram-positivas e superiores para bactérias Gram-negativas (Houari & Di Martino, 2007; Fazlara & Ekhtelat, 2012). Para que os desinfetantes sejam eficazes, têm que penetrar a parede celular e atingir uma concentração suficientemente alta nos locais alvo para conseguir exercer a sua ação antimicrobiana (Cloete, 2003). O modo de ação do cloreto de benzalcónio consiste em alterar a permeabilidade das membranas celulares, provocando a saída de material citoplasmático a baixas concentrações, ao passo que a altas concentrações se liga a grupos carboxílicos, provocando coagulação geral do citoplasma bacteriano (To, Favrin, Romanova & Griffiths, 2002; Fazlara & Ekhtelat, 2012). Assim sendo, o facto das bactérias Gram-negativas terem CMI e CMB mais altas pode ser explicada pelo facto destas possuírem mecanismos de resistência mais desenvolvidos relacionados com a composição da sua parede celular. Esta é dotada de uma membrana externa e interna, sendo a membrana externa rica em lipopolissacarídeos, que por sua vez contribuem para a impermeabilidade destes microrganismos a agentes antimicrobianos (Denyer & Maillard, 2002). As bactérias Gram-positivas, por sua vez, possuem uma parede celular que é constituída apenas pela membrana citoplasmática rodeada por uma camada espessa de peptidoglicanos, sendo mais permeáveis e suscetíveis à ação de antimicrobianos e neste caso, do cloreto de benzalcónio (Simões, Simões & Vieira, 2010^b).

Em comparação com os resultados dos antibiogramas realizados previamente, o facto de se ter obtido uma CMI mais elevada para o isolado de *P. aeruginosa* vai ao encontro da

elevada resistência que este demonstrou aos antibióticos. Os restantes isolados bacterianos, que demonstraram ser mais sensíveis aos antibióticos, também demonstraram ser mais sensíveis ao desinfetante visto que se obtiveram CMI inferiores. A exceção foi *B. cereus*, que apesar de se ter revelado resistente aos antibióticos, demonstrou ser bastante sensível ao desinfetante, o que pode ser explicado pelo facto deste microrganismo ser uma bactéria gram-positiva e sofrer mais facilmente a ação do biocida testado.

Tal como o cloreto de benzalcónio, alguns antibióticos também exercem ação na parede celular. É o caso dos beta-lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), bacitracina, glicopéptidos e fosfomicina, que interferem com a síntese da parede celular, e ainda as polimixinas, que tal como o cloreto de benzalcónio, alteram a permeabilidade da membrana celular. No entanto, as polimixinas são mais eficazes contra bactérias Gram-negativas uma vez que se ligam especificamente aos lipopolissacarídeos (Spinosa^a, 2011; Spinosa^b, 2011).

3.3 Determinações das concentrações mínimas bactericidas dos 5 isolados bacterianos em biofilmes multiespécies

De seguida apresentam-se as CMB obtidas para cada um dos 5 isolados bacterianos, que se encontravam em conjunto, em biofilmes multiespécies. Foram testadas várias concentrações do biocida em células de biofilme a vários tempos de contacto. A interpretação dos resultados baseou-se na observação de presença (+) ou ausência (-) de desenvolvimento bacteriano, após sementeira das células dos biofilmes dos tubos de ensaio para caixas de Petri contendo os meios apropriados ao crescimento de cada espécie bacteriana e isentos de agentes antimicrobianos.

A tabela 4 representa os resultados obtidos aos 30 minutos de ação do biocida cloreto de benzalcónio, nas concentrações de 2, 6, 10 e 15 µg/mL.

Tabela 4: Resultados obtidos para cada isolado bacteriano, em biofilmes multiespécies e sujeitas durante 30 minutos à ação do cloreto de benzalcónio a várias concentrações, com presença (+) ou ausência (-) de desenvolvimento bacteriano

Isolados bacterianos em conjunto no biofilme	Concentrações testadas (µg/mL)				Controlo
	2	6	10	15	
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> Typhimurium	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	+	-	-	+	+
<i>Staphylococcus spp</i>	+	-	-	+	+

Observa-se que os isolados de *E.coli*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* desenvolveram-se em todas as concentrações testadas. Já os isolados de *B. cereus* e *Staphylococcus spp* desenvolveram-se a 2 e 15 µg/mL, não se observando desenvolvimento a 6 e a 10 µg/mL.

A tabela 5 representa os resultados obtidos às 2 horas de ação do biocida cloreto de benzalcónio, nas concentrações de 2, 6 ,10,15, 16, 17,18, 19 e 20 µg/mL.

Tabela 5: Resultados obtidos para cada isolado bacteriano, em biofilmes multiespécies e sujeitas durante 2 horas à ação do cloreto de benzalcónio a várias concentrações, com presença (+) ou ausência(-) de desenvolvimento bacteriano

Isolados bacterianos em conjunto no biofilme	Concentrações testadas (µg/mL)									Controlo
	2	6	10	15	16	17	18	19	20	
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> Typhimurium	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus spp</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+

Observa-se que os isolados de *E. coli*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* desenvolveram-se em todas as concentrações testadas. *B. cereus* desenvolveu-se a 2, 15 16, 17, 18, 19 e 20 µg/mL, não se observando desenvolvimento a 6 e 10 µg/mL. *Staphylococcus spp* desenvolveu-se apenas a 2 e 15 µg/mL.

A tabela 6 representa os resultados obtidos às 24 horas de ação do biocida cloreto de benzalcônio, nas concentrações de 2, 6, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 µg/mL.

Tabela 6: Resultados obtidos para cada isolado bacteriano em conjunto, em biofilmes multiespécies e sujeitas durante 24 horas à ação do cloreto de benzalcônio a várias concentrações, com presença (+) ou ausência (-) de desenvolvimento bacteriano

Isolados bacterianos em conjunto no biofilme	CONCENTRAÇÕES TESTADAS(µg/mL)																	CONT ROLO
	2	6	10	15	16	17	18	19	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Salmonella Typhimurium</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Bacillus cereus</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Staphylococcus spp.</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Observa-se que os isolados de *E. coli*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* desenvolveram-se nas concentrações 2, 6, 10, 15, 19 e 20 µg/mL. Não se desenvolveram a 16, 17 µg/mL, 18, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 µg/mL. *B. cereus* e *Staphylococcus spp* desenvolveram-se a 2 e 15 µg/mL, não se desenvolvendo nas restantes concentrações testadas.

A Tabela 7 representa as concentrações mínimas bactericidas determinadas para cada uma das 5 espécies bacterianas em biofilme multiespécies.

Tabela 7: Concentrações mínimas bactericidas de cloreto de benzalcônio para os 5 isolados em biofilme

Isolado	Concentração mínima bactericida (µg/mL)
<i>Escherichia coli</i>	20
<i>Salmonella Typhimurium</i>	20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
<i>Bacillus cereus</i>	15
<i>Staphylococcus spp.</i>	15

A concentração mínima bactericida (CMB) é a concentração mais baixa de antimicrobiano que previne a multiplicação de um determinado microrganismo após a sua sementeira em meio isento de agentes antimicrobianos (Zarakolu, Çöplü, Arslantürk, Levent & Güvener, 1999; Andrews, 2001; Macià, Rojo-Molinero & Oliver, 2014). Em biofilmes, este parâmetro pode ainda ser definido como a concentração mínima de erradicação de biofilmes (MBEC), ou seja, a concentração mínima de antimicrobiano que previne a multiplicação de todas as bactérias provenientes de biofilmes (Girard, Ceri, Gibb, Olson & Sepandj, 2010).

Em comparação com as CMI determinadas para cada isolado na sua forma plantónica, observa-se que para os isolados contidos em biofilme, a CMB foi aproximadamente 3 vezes superior no caso do isolado de *P. aeruginosa* (aumentando de 6 µg/mL para 20 µg/mL), 20 vezes superior no caso do isolado de *E. coli* e *S. Typhimurium* (aumentando de 1 µg/mL para 20 µg/mL) e 75 vezes superior no caso do isolado de *B. cereus* e *Staphylococcus* spp. (aumentando de 0,2 µg/mL para 15 µg/mL). Apesar de se ter verificado um aumento considerável na CMB dos isolados de *Staphylococcus* spp. e *B. cereus*, estes continuam a revelar-se mais suscetíveis ao biocida visto que as suas CMB são inferiores às das outras espécies.

O facto de as CMB terem aumentado para cada isolado evidencia que as células microbianas presentes em biofilmes são mais resistentes aos agentes antimicrobianos do que as suas formas plantónicas, tal como já foi sugerido por vários autores (Lewis, 2001; Spoering & Lewis, 2001; Bridier et al., 2011; Macia, Rojo-Molinero & Oliver, 2014). Um dos factores que contribui para uma maior resistência aos antimicrobianos é a penetração limitada dos biocidas nos biofilmes, uma vez que os biofilmes encontram-se encapsulados numa matriz extracelular, constituída por várias camadas de substâncias poliméricas extracelulares, constituindo uma barreira à entrada de moléculas antimicrobianas (Bridier et al., 2011). Outra característica importante das células em biofilmes que contribui para a sua tolerância a antimicrobianos é o facto destas possuírem um ritmo de crescimento lento, tendo em conta que a maioria dos agentes antimicrobianos, em particular antibióticos, apenas são eficazes em células de crescimento rápido (Lewis, 2001). Finalmente, realça-se o facto de que quando se encontram em biofilme, as bactérias têm a capacidade de se comportar coletivamente, estabelecendo entre si uma comunicação intercelular através de pequenas moléculas sinalizadoras designadas por autoindutores, e que são produzidas por cada um dos microrganismos envolvidos no biofilme (Kievit & Iglewski, 2000). Através destes autoindutores, as bactérias conseguem regular o seu comportamento de acordo com a densidade populacional. Este fenómeno designa-se por *quorum sensing* (Okhiria, 2010). Neste processo, quando o número de bactérias é suficiente, há a produção de uma elevada quantidade de autoindutores, que atingem concentrações que permitem às bactérias

detetarem que estão na presença de uma massa celular elevada e, em resposta a isso, ocorre a ativação ou inativação de genes (Kievit & Iglewski, 2000). Esta interação sinérgica favorece a tolerância aos antimicrobianos através da produção de maior quantidade de biomassa, da produção de polímeros característicos de cada espécie que aumentam a viscosidade da matriz dificultando ainda mais a penetração de agentes estranhos e através da produção de enzimas que, em conjunto, conseguem inativar compostos tóxicos (Bridier *et al.*, 2011).

Observou-se que o tempo de ação do desinfetante também influencia os resultados, visto que quanto mais curta a sua ação (30 minutos ou 2 horas), menos suscetíveis foram os microrganismos ao desinfetante.

Alguns resultados obtidos neste procedimento experimental não foram consistentes, como o facto de aos 30 minutos e 2 horas de ação do desinfetante, os isolados de *Staphylococcus spp* e *B. cereus* não terem crescido a 6 e 10 µg/mL, mas terem crescido a 15 µg/mL. Outro resultado inconsistente foi a ausência de crescimento dos isolados de *P.s aeruginosa*, *E.coli* e *S. Typhimurium* nas concentrações de 16,17 e 18 µg/mL, tendo esses isolados crescido a 19 µg/mL e 20 µg/mL, às 24 horas de ação do desinfetante. Estes resultados podem estar relacionados com o facto da metodologia adotada neste procedimento experimental para o estudo dos biofilmes não ser a mais adequada para manter a preservação dos mesmos, uma vez que estes foram sujeitos a várias ações mecânicas que podem ter comprometido a sua integridade. O protocolo em que se baseou este procedimento experimental (Anexo I), recomenda a adição da solução neutralizante ao biofilme que já se encontra imerso na solução com o desinfetante, sem proceder à remoção prévia da solução com desinfetante. Neste procedimento experimental, fez-se a remoção da solução com desinfetante, e só após este passo é que se adicionou a solução neutralizante (Nutrient-Broth). Este passo sujeitou os biofilmes a mais ações mecânicas podem ter comprometido a sua preservação, reduzindo-se o número de bactérias presentes e possíveis de serem detetadas.

Demonstrou-se novamente que o desinfetante cloreto de benzalcónio é mais eficaz contra bactérias Gram-positivas do que Gram-negativas mas que apesar disso, em biofilme, são necessárias concentrações mais elevadas deste composto para que seja eficaz.

Foram ainda feitos antibiogramas para os isolados de *E. coli* e *S. Typhimurium* (Tabela 8), após estas espécie terem sido sujeitas à ação do biocida em biofilme, revelando que estas mantiveram as suas sensibilidades aos mesmos antibióticos testados no início, o que sustenta a hipótese de que a sua resistência à ação do biocida em biofilme é um fenómeno de natureza física, relacionado com as características do biofilme. No entanto, vários autores referem a possibilidade dos biocidas induzirem nas bactérias co-resistência a antibióticos através de mutações genéticas ou transferência de genes. (Russell, Tattawasart, Maillard & Furr 1998; Poole, 2002; Pal, Bengtsson-Palme, Kristiansson & Larsson, 2015).

Tabela 8: Resultados do antibiograma feito aos isolados de *E.coli* e *S. Typhimurium* sujeita à ação do biocida, em biofilme, na concentração de 2 µg/mL

Substância Ativa	Isolado bacteriano	Diâmetro da zona de inibição de crescimento (mm)	Critérios Estabelecidos (mm)		Interpretação
			Sensível (≥)	Resistente (<)	
Ampicilina	<i>Escherichia coli</i>	0	17	13	Resistente
	<i>Salmonella Typhimurium</i>	23	17	13	Sensível
Cefotaxime	<i>Escherichia coli</i>	35	21	17	Sensível
	<i>Salmonella Typhimurium</i>	33	21	17	Sensível
Cloranfenicol	<i>Escherichia coli</i>	33	18	12	Sensível
	<i>Salmonella Typhimurium</i>	30	18	12	Sensível
Oxitetraciclina	<i>Escherichia coli</i>	22	15	11	Sensível
	<i>Salmonella Typhimurium</i>	21	15	11	Sensível
Ácido Nalidíxico	<i>Escherichia coli</i>	23	23	16	Sensível
	<i>Salmonella Typhimurium</i>	25	23	16	Sensível

3.4 Determinação da concentração mínima bactericida de cloreto de benzalcônio dos 3 isolados bacterianos resistentes ao biocida em biofilmes constituídos 2 isolados bacterianos

Do ensaio anterior, verificou-se que 3 isolados bacterianos foram resistentes à ação do biocida, nomeadamente as espécies de *P. aeruginosa*, *S. Typhimurium* e *E. coli*. Nesta etapa do procedimento experimental, produziram-se biofilmes constituídos por conjuntos de 2 isolados bacterianos (dos 3 isolados resistentes), que foram sujeitos a várias concentrações do biocida.. De seguida apresentam-se as CMB de cloreto de benzalcônio obtidas para cada um dos 3 isolados bacterianas, que se encontravam em conjunto com outra isolado, nos biofilmes referidos. A interpretação dos resultados baseou-se na observação de presença (+) ou ausência (-) de desenvolvimento bacteriano, após sementeira das células dos biofilmes dos tubos de ensaio para os meios apropriados ao crescimento de cada espécie bacteriana e isentos de agentes antimicrobianos, em caixas de Petri. Neste ensaio todos os biofilmes foram sujeitos à ação do biocida durante 24 horas. A tabela 9 representa os resultados obtidos neste ensaio.

Tabela 9: Concentrações mínimas bactericidas obtidas para os isolados de *P.aeruginosa*, *E. coli* e *S. Typhimurium*, em biofilmes constituídos por dois isolados bacterianos, com presença (+) ou ausência(-) de desenvolvimento bacteriano

Constituição do Biofilme	Isolado bacteriano	Concentrações testadas (µg/mL)					Controlo	Concentração mínima bactericida (µg/mL)
		1	5	10	15	20		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	N/A	+	+	+	-	+	15
	<i>Escherichia coli</i>	N/A	+	+	+	+	+	20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Salmonella Typhimurium</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	N/A	+	+	-	-	+	10
	<i>Salmonella Typhimurium</i>	N/A	+	-	-	-	+	5
<i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella Typhimurium</i>	<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	-	N/A	+	1
	<i>Salmonella Typhimurium</i>	+	-	-	-	N/A	+	1

N/A: Não aplicável

No biofilme constituído pelos isolados de *P. aeruginosa* e *E. coli*, que foram expostos às concentrações de 5, 10, 15 e 20 µg/mL, observou-se que o isolado de *P. aeruginosa* se desenvolveu a 5, 10 e 15 µg/mL, enquanto que o isolado de *E. coli* se desenvolveu em todas as concentrações testadas (Tabela 9). Neste biofilme, a CMB obtida para o isolado de *P. aeruginosa* foi 15 µg/mL e para o isolado de *E. coli* foi 20 µg/mL (Tabela 9). A CMB obtida para o isolado de *P. aeruginosa* foi 2.5 vezes superior à obtida na sua forma plantónica (6 µg/mL) e 1.3 vezes inferior à obtida no biofilme composto pelos 5 isolados, ao passo que para o isolado de *Escherichia coli*, a CMB obtida foi 20 vezes superior à obtida na sua forma plantónica (1 µg/mL) e foi igual à que se obteve no biofilme composto pelos 5 isolados (20 µg/mL).

No biofilme constituído pelos isolados de *P. aeruginosa* e *S. Typhimurium*, que foram expostos às concentrações de 5, 10, 15 e 20 µg/mL, observou-se que o isolado de *P. aeruginosa* desenvolveu-se a 5 e 10 µg/mL, não se desenvolvendo a 15 e 20 µg/mL, enquanto que o isolado de *S. Typhimurium* apenas se desenvolveu a 5 µg/mL (Tabela 9). A CMB obtida para o isolado de *P. aeruginosa* foi 10 µg/mL e para o isolado de *S. Typhimurium* foi 5 µg/mL (Tabela 9). A CMB obtida para o isolado de *P. aeruginosa* neste biofilme foi 1.6 vezes superior à obtida na sua forma plantónica (6 µg/mL) e 3.3 vezes inferior à que se obteve no biofilme composto pelos 5 isolados (20 µg/mL).

No biofilme constituído pelos isolados de *E. coli* e *S. Typhimurium*, que foram expostos às concentrações de 1, 5, 10 e 15 µg/mL, observou-se que ambos os isolados apenas se desenvolveram a 1 µg/mL (Tabela 9). Neste biofilme, a CMB obtida para os isolados de *E. coli* e *S. Typhimurium* foi 1 µg/mL. As CMB obtidas pelos dois isolados mantiveram-se iguais às CMI que se obtiveram nas suas formas plantónicas (1 µg/mL) e foi 20 vezes inferior às CMB obtidas no biofilme composto pelos 5 isolados.

Os resultados obtidos demonstram que os isolados de *S. Typhimurium* e *E. coli* apresentam maior resistência ao biocida cloreto de benzalcónio quando se encontram na presença do isolado de *P. aeruginosa*. Já se encontra bem documentado que em biofilmes compostos por mais do que uma espécie microbiana, a susceptibilidade individual a agentes antimicrobianos dos microrganismos que os compõem diminui (Lindsay, Bröezel, Mostert & Von Holy, 2002; Burmølle, Webb, Rao, Hansen, Sørensen & Kjelleberg, 2006; Simões, Simões & Vieira, 2010^b; Varposhti, Entezari & Feizabadi; 2014;). Não se encontraram estudos que avaliem a eficácia de desinfetantes em biofilmes constituídos pelos mesmos conjuntos de duas espécies microbianas que foram avaliadas neste ensaio, no entanto já existem estudos que sugerem explicações para o facto da espécie de *Pseudomonas* spp. potenciar a sobrevivência de outros microrganismos quando contidos no mesmo biofilme. Lindsay, Bröezel, Mostert & Von Holy (2002), observaram que, quando em associação com a espécie *B. cereus*, a espécie de *Pseudomonas fluorescens* produzia substâncias

poliméricas extracelulares que protegem a espécie de *B. cereus* da ação do biocida dióxido de cloro. Sanchez-Vizuet, Orgaz, Aymerich, LeCoq e Briandet (2015), sugerem que as substâncias poliméricas extracelulares constituintes da matriz que contribuem para a proteção de outras bactérias são hidrolases específicas e substâncias amilóides. Os mesmos autores referem que o facto da espécie de *P. aeruginosa* produzir um sideróforo designado por piocianina, induzia o aparecimento de células persistentes em outras bactérias, nomeadamente em *Acinetobacter baumannii*. As células persistentes são pequenas populações de células microbianas que são mais tolerantes a antimicrobianos (Dawson, Intapa & Jabra-Rizk, 2011). Por outro lado Iriea et al., (2012), demonstraram ainda que a espécie *Pseudomonas aeruginosa* sintetiza um polissacarídeo designado por Psl que estimula as outras bactérias a produzir componentes da matriz do biofilme, contribuindo para o aumento da sua massa.

Alguns autores observaram um efeito sinérgico entre as espécies de *P. aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* quando presentes em feridas de coelhos, provocando um atraso na respetiva cura e ativando uma resposta inflamatória do hospedeiro (Seth, Geringer, Hong, Leung, Galiano & Mustoe, 2012). Estes autores sugerem que a interação entre estas duas espécies levava a um aumento da virulência em ambas.

Foi ainda feito um antibiograma para o isolado de *E. coli* que sobreviveu à ação do desinfetante a 20 µg/mL em conjunto com o isolado de *P. aeruginosa* (Tabela 10).

Tabela 10: Antibiograma feito para o isolado de *E. coli* que sobreviveu em biofilme com *P.aeruginosa* a 20 µg/mL

Substância Ativa	Diâmetro da zona de inibição de crescimento inicial (mm)	Diâmetro da zona de inibição de crescimento (mm)	Critérios Estabelecidos (mm)		Interpretação
			Sensível (≥)	Resistente (<)	
Ampicilina	0	0	17	13	Resistente
Cefotaxime	35	20	21	17	Intermédio
Cloranfenicol	30	15	18	12	Intermédio
Oxitetraciclina	28	18	15	11	Sensível
Ácido Nalidíxico	26	0	23	16	Resistente

Os resultados do antibiograma revelam que o isolado de *E. coli* adquiriu resistência a alguns dos antibióticos testados inicialmente, nomeadamente ao ao ácido nalidíxico, ao passo que ao cefotaxime e oxitetraciclina revelou sensibilidade intermédia (Tabela 10). Estes

resultados contrariam os dos antibiogramas feitos no ensaio anterior, em que esta espécie manteve a sensibilidade aos antibióticos, sugerindo que o mecanismo de tolerância ao biocida seria um fenómeno de natureza física, devido às características de composição do biofilme. A resistência aos antibióticos pode ter resultado da exposição ao biocida ou da interação entre as espécies bacterianas. Já se encontra descrito que a exposição a biocidas pode resultar em mutações genéticas que levam à sobre-expressão de genes que regulam as bombas de efluxo. As bombas de efluxo por sua vez, atuam simultaneamente contra antibióticos e biocidas, levando a um fenómeno de co-resistência (Poole, 2002). Por outro lado, Trejo-Hernández, Andrade-Domínguez, Hernández & Encarnación (2014), demonstraram que em biofilmes compostos pelas espécies de *P. aeruginosa* e *Candida albicans*, a interação e competição entre estes microrganismos quando sujeitos a stress levava à indução de alterações a nível dos genes expressados em *P.aeruginosa*, o que permitia a esta espécie produzir um maior número de fatores de virulência e a expressar em maior grau proteínas de membrana envolvidas na resistência a antibióticos. Deduz-se que a resistência adquirida aos antibióticos pelo isolado de *E.coli* pode ter resultado num destes factores referidos, ou na combinação de ambos.

A maioria dos estudos *in vitro* existentes atualmente, avaliaram a eficácia de desinfetantes em biofilmes constituídos por uma espécie bacteriana. No entanto, já se encontra descrito que a presença de duas espécies bacterianas em biofilme aumenta mutuamente as suas hipóteses de sobrevivência à exposição a biocidas, em comparação com biofilmes constituídos por uma espécie bacteriana (Lindsay *et al.*, 2002).

3.5 Determinação da concentração mínima bactericida de cloreto de benzalcónio em biofilmes constituídos por um isolado bacteriano

Nesta etapa do procedimento experimental, produziram-se biofilmes constituídos por 1 isolado bacteriano (dos 3 isolados resistentes). De seguida apresentam-se os resultados dos ensaios feitos com o biocida cloreto de benzalcónio nos biofilmes referidos. A interpretação dos resultados baseou-se na observação de presença (+) ou ausência (-) de desenvolvimento bacteriano, após sementeira das células dos biofilmes dos tubos de ensaio para caixas de Petri. Neste ensaio todos os biofilmes foram sujeitos à ação do biocida durante 24 horas. A tabela 11 representa os resultados obtidos neste ensaio.

Tabela 11: Concentrações mínimas bactericidas de cloreto de benzalcónio obtidas para os isolados de *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. Typhimurium*, em biofilmes constituídos por um isolado bacteriano, com presença (+) ou ausência(-) de desenvolvimento bacteriano

Isolado bacteriano presente no biofilme	Concentrações (µg/mL)																Controlo	Concentração mínima bactericida (µg/mL)
	1	2	3	4	5	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	N / A	N/ A	N/ A	N/ A	N/ A	-	+	-	+	+	-	N/ A	N/ A	N/ A	N/ A	N/ A	+	19
<i>Escherichia coli</i>	N / A	N/ A	N/ A	N/ A	N/ A	N/ A	N/ A	N/ A	N/ A	N/ A	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Salmonella Typhimurium</i>	+	-	-	-	-	N/ A	N/ A	N/ A	N/ A	N/ A	N/ A	N/ A	N/ A	N/ A	N/ A	N/ A	+	1

N/A-Não aplicável

No biofilme constituído pelo isolado de *P. aeruginosa*, este foi sujeita às concentrações de 15,16, 17, 18, 19 e 20 µg/mL. *P. aeruginosa* apenas se desenvolveu a 16,18 e 19 µg/mL. Como tal, a CMB obtida para este isolado foi 19 µg/mL, um valor 3.8 vezes superior ao valor de CMI obtido para a sua forma plantónica.

No biofilme constituído pelo isolado de *E. coli*, este foi sujeita às concentrações de 20, 21, 22, 23, 24 e 25 µg/mL. *E. coli* não se desenvolveu em nenhuma concentração testada, por isso considerou-se 1 µg/mL como sendo a sua CMB, valor igual ao valor de CMI obtido para a sua forma plantónica.

No biofilme constituído pela espécie de *S. Typhimurium*, este foi sujeita às concentrações de 1, 2, 3, 4 e 5 µg/mL. *S. Typhimurium* só cresceu a 1 µg/mL, considerando-se essa a CMB, mantendo-se este valor igual ao valor de CMI obtido para a sua forma plantónica.

O biocida cloreto de benzalcónio manteve a sua eficácia a uma concentração de 1 µg/mL contra os isolados de *S. Typhimurium* e *E. coli* em biofilme, ao passo que no caso de *P. aeruginosa*, apenas foi eficaz a 20 µg/mL.

Como se pode verificar, o isolado de *P. aeruginosa* foi o único cujo valor de CMB aumentou em biofilme, comparativamente com a CMB obtida na sua forma plantónica. Já vários estudos demonstraram que os biofilmes constituídos pela espécie de *P. aeruginosa* têm uma resistência elevada a muitos antimicrobianos, sendo que esses estudos indicam que esta resistência se deve em grande parte ao exopolissacarídeo alginato, que é sintetizado pela espécie de *P. aeruginosa* e que exerce um efeito protetor considerável contra agentes antimicrobianos (Hentzer et al., 2001; Leid et al., 2005; Cotton, Graham & Lee, 2009).

Os resultados obtidos neste ensaio permitem observar que para o caso dos isolados de *S. Typhimurium* e *E. coli*, o facto destas se encontrarem em biofilme não altera a sua susceptibilidade ao desinfetante cloreto de benzalcónio, sendo este igualmente eficaz contra essas espécies quer estas se encontrem na sua forma plantónica ou em biofilme.

Analisando os resultados deste ensaio e do ensaio anterior, deduz-se que o isolado de *P. aeruginosa* foi o microrganismo que contribuiu para que os isolados de *S. Typhimurium* e *E. coli* se tornassem menos suscetíveis ao biocida quando estas se encontravam incluídas em biofilmes multiespécies, uma vez que na ausência do isolado de *P. aeruginosa*, tanto os isolados de *S. Typhimurium* como *E. coli* tiveram um valor de CMB igual ao CMI obtido para as suas formas plantónicas.

Neste ensaio surgiram novamente alguns resultados inconsistentes, nomeadamente o facto do isolado de *P. aeruginosa* não se ter desenvolvido a 15 e a 17 µg/mL, mas ter-se desenvolvido a 16, 18 e 19 µg/mL. Estes resultados podem ser devido ao facto da metodologia adotada não ser a mais adequada na preservação de biofilmes, uma vez que as ações mecânicas às quais os biofilmes eram sujeitos neste procedimento experimental podem ter comprometido a integridade dos mesmos, reduzindo o número de células presentes, o que justificaria os resultados negativos obtidos nas concentrações de 15 e 17 µg/mL para o isolado de *P. aeruginosa*.

Conclusões gerais

No presente trabalho experimental, foi feito o estudo da eficácia do biocida cloreto de benzalcônio através da determinação de concentrações mínimas inibitórias e bactericidas desse composto nos isolados bacterianos de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus* spp., na sua forma plantônica e em biofilmes. Os objetivos propostos à realização do procedimento experimental foram atingidos, retirando-se as seguintes conclusões:

- Na forma plantônica de cada isolado bacteriano, o biocida cloreto de benzalcônio é mais eficaz em isolados de bactérias Gram-positivas, uma vez que se obtiveram valores inferiores de CMI para essas espécies, em comparação com os valores de CMI obtidos para as bactérias Gram-negativas
- O biocida cloreto de benzalcônio é menos eficaz em todos os isolados bacterianos quando estas se encontram em biofilmes multiespécies, continuando no entanto a apresentar maior eficácia contra as bactérias Gram-positivas, uma vez que os valores de CMB obtidas para essas espécies foram inferiores aos de CMB obtidos para as bactérias Gram-negativas
- O isolado de *P.aeruginosa* foi o que contribuiu para uma maior resistência dos outros isolados bacterianos ao biocida, quando se encontram em biofilmes multiespécies, uma vez que na sua ausência, as outras espécies bacterianas mantiveram um valor de CMB igual ao valor de CMI obtido para as suas formas plantônicas
- O procedimento experimental adotado foi adequado à realização do estudo proposto, possuindo no entanto limitações que se traduziram na obtenção de alguns resultados inconsistentes

Atualmente ainda não existem muitos estudos que avaliem a eficácia de biocidas através da determinação de CMB em biofilmes constituídos por várias espécies microbianas. Por outro lado, a natureza variada dos biofilmes traduz-se numa dificuldade em prever os resultados da sua interação com biocidas. Assim sendo, justifica-se o desenvolvimento de protocolos que permitam fazer estudos de eficácia de biocidas em biofilmes, de modo a aprofundar os conhecimentos nesta área.

Bibliografia

Angel D. E., Morey, P., Storer, J. G., Mwipatayi, B.P. (2008). Iodine in wound care: a review of the literature. *Wound Practice and Research*. 16 (1), 6-21

American Society for Testing Materials. (2012). *Standard Test Method for Evaluating Disinfectant Efficacy against Pseudomonas aeruginosa Biofilm Grown in CDC Biofilm Reactor using Single Tube Method*. West Conshohocken, PA: ASTM International

Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 48, 5-16

Araújo, P., Lemons, M., Mergulhão, F., Melo, L., Simões, M. (2011). Antimicrobial resistance to disinfectants in biofilms. In Méndez-Vilas, A. (Ed.). *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. (pp 826-834). Badajoz, Spain: Formatex Research Center

Barah, F. (2013). Non-antibiotic biocides: an updated review. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. (pp 598-605). Badajoz, Spain: Formatex Research Center

Bennett, P. M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*. 153, 347–357

Billings, N., Birjiniuk, A., Samad, T. S., Doyle, P. S., Ribbeck, K. (2015). Material properties of biofilms—a review of methods for understanding permeability and mechanics. *Reports on Progress in Physics*. 78, 1-17

Blancou, J. (1995). History of disinfection from early times until the end of the 18th century. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*. 14 (1) ,31-39

Bridiera, A., Briandeta, R., Thomasc, V., Dubois-Brissonnet, F. (2011). Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling*. 27, 1017–1032

Burmølle, M., Webb, J. S., Rao, D., Hansen, L. H., Sørensen, S. J., Kjelleberg, S. (2006). Enhanced Biofilm Formation and Increased Resistance to Antimicrobial Agents and Bacterial Invasion Are Caused by Synergistic Interactions in Multispecies Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 72 (6), 3916–3923

Cheung, H. Y., Wong, M. N. K., Cheung, S. H., Liang, L.Y., Lam., Y. W., Chiu, S. K. (2011). Differential Actions of Chlorhexidine on the Cell Wall of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Plos One*, 7, Article e36659. Acedido em Abr, 24, 2016, disponível em: <http://journals.plos.org/plosone/article/asset?id=10.1371%2Fjournal.pone.0036659.PDF>

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2015). *VET01S: Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard*. Wayne: CLSI.

Cloete, T. E., Jacobs, L., Brozel, V. S. (1998). The chemical control of biofouling in industrial water systems. *Biodegradation*. 9 (1), 22-37

Cloete, T.E. (2003). Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 51, 277-282.

Cotton, L. A., Graham, R. J., Lee, R. J. (2009). The Role of Alginate in *P. aeruginosa* PAO1 Biofilm Structural Resistance to Gentamicin and Ciprofloxacin. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology*. 13: 58-62

Dawson, C. C., Intapa, C., Jabra-Rizk, M. A. (2011). “Persisters”: Survival at the Cellular Level. *Plos Pathogens*. 7. Article e1002121. Acedido em Jun, 18, 2016, disponível em <http://journals.plos.org/plospathogens/article/asset?id=10.1371%2Fjournal.ppat.1002121.PDF>

Decreto-lei n.º 121/2002 de 3 de Maio. Diário da República n.º 102 I Série-A. Ministério da Saúde. Lisboa

Demple, B. (1996). Redox signaling and gene control in the *Escherichia coli* soxRS oxidative stress regulon- a review. *Gene*.179, 53-57

Denyer, S. P., Maillard, J. Y. (2002). Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*. 92, 35–45

Denyer, S. P., Maillard, J. Y. (2011). Non-antibiotic microbial agents: mode of action and resistance. In Denyer, S. P., Hodges, N. A., Gorman S. P., Gilmore, B. F. (Eds). *Hugo & Russel's pharmaceutical microbiology*. (8th ed) John Wiley & Sons. West Sussex: UK.

Direção-Geral de Saúde (2015). *Colocação de produtos biocidas no mercado nacional*. Acedido em Mai.16, 2016, disponível em <http://www.dgs.pt/saude-ambiental/areas-de-intervencao/riscos-quimicos-e-biologicos.aspx>

Diretiva 98/8 de 16 de Fevereiro de 1998 do Parlamento Europeu e do Conselho. Jornal Oficial das Comunidades Europeias. Nº L 123/1 de 24.4.98

Dunne, M. J. (2002). Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? *Clinical Microbiology Reviews*. 15 (2), 156-166.

Dutta, V., Elhanafi, D., Kathariou, S. (2013). Conservation and Distribution of the Benzalkonium Chloride Resistance Cassette bcrABC in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. 79 (19), 6067– 6074

Agência Europeia de Produtos Químicos (2016). Transitional Guidance on the Biocidal Products: Regulation Transitional Guidance on Efficacy Assessment for Product Types 1-5, Disinfectants. European Chemicals Agency. Helsinki: ECHA

Fazlara, A., Ekhtelat, M. (2012). The Disinfectant Effects of Benzalkonium Chloride on Some Important Foodborne Pathogens. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*. 12 (1), 23-29

Fazlara, A., Maryam, E. (2012). The Disinfectant Effects of Benzalkonium Chloride on Some Important Foodborne Pathogens. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*. 12, 23-29

Finnegan, M., Linley, E., Denyer, S. P., McDonnell, G., Simons C., Maillard, J.Y. (2010). Mode of action of hydrogen peroxide and other oxidizing agents: differences between liquid and gas forms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 65(10):2108-15

Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*. 14, 563-575

Fraise, A. P. (2002). Biocide abuse and antimicrobial resistance-a cause of concern? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 49, 11-12

- Fukuzaki, S. (2006). Mechanisms of action of Sodium Hypochlorite in Cleaning and Disinfection Processes. *Biocontrol Science*. 11 (4), 147-157
- Gerba, C. P. (2015). Quaternary Ammonium Biocides: Efficacy in Application. *Applied and Environmental Microbiology*. 81 (2), 464-469
- Hentzer, M., Teitzel, G. M., Balzer, G. J., Heydorn, A., Molin, S., Givskov, M., Parsek, M. R. (2001). Alginate Overproduction Affects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Structure and Function. *Journal of Bacteriology*. 183 (18), 5395–5401
- Hett, E. C., Rubin, E. J. (2008). Bacterial Growth and Cell Division: a Mycobacterial Perspective. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 72,126-156
- Houari, A., Di Martino, P. (2007). Effect of chlorhexidine and benzalkonium chloride on bacterial biofilm formation. *Letters in Applied Microbiology*. 45, 652–656
- Houdt, R. V., Michiels, C. W. (2010). Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology*. 4, 1117-31
- Kievit, T. R., Iglewski, B. H. (2000). Bacterial Quorum Sensing in Pathogenic Relationships. *Infection and Immunity*. 68, 4839–4849
- Irie, Y., Parsek, M. R. (2008). Quorum sensing and microbial biofilms. *Current topics in microbiology and immunology*. 322, 67-84
- Irie, Y., Borleea, B. R., O'Connora, J. R., Hillb, P. J., Harwooda, C. S., Wozniakb, D. J., Parsek, M.R. (2012). Self-produced exopolysaccharide is a signal that stimulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy Sciences*. 109 (50), 20632–20636
- Jung, W. K., Koo, H. C., Kim, K. W., Shin, S., Kim, S. H., Park, Y. H. (2008). Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver Ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 7 (74), 2171–2178.
- Khajavi, R., Sattari, M., Ashjarian, A. (2007). The antimicrobial effect of benzalkonium chloride on some pathogenic microbes observed on fibers of acrylic carpet. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 10 (4), 598-601

Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., Hultgren, S. J. Bacterial Biofilms: Development, Dispersal and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 3 (4), 1-23

Kumar, C. G., Anand, S. K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 42, 9-27

Leid, J. G., Willson, C. J., Shirtliff, M. E., Hassett, D. J., Parsek, M. R., Jeffers, A. K. (2005). The Exopolysaccharide Alginate Protects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Bacteria from IFN- γ -Mediated Macrophage Killing. *The Journal of Immunology*. 175 (11), 7512-8.

Levy, S. B. (2002). Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*. 92, 65–71

Lewis, K. (2001). Riddle of Biofilm Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45 (4), 999–1007

Lewis, K. (2005). Persister Cells and the Riddle of Biofilm Survival. *Biochemistry*. 70 (2), 327-336

Lindsay, D., Bröezel, V. S., Mostert, J. F., Von Holy, A. (2002). Differential efficacy of a chlorine dioxide-containing sanitizer against single species and binary biofilms of a dairy-associated *Bacillus cereus* and a *Pseudomonas fluorescens* isolate. *Journal of Applied Microbiology*. 92, 352-361

Macia, M. D., Rojo-Molinero, E., Oliver, A. (2014). Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*. 20, 981–990

Mah, T. C., O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*. 9, 34-39

Maillard, J. Y. (2005). Testing the effectiveness of disinfectants and sanitisers. In H. L. M. Lelieveld & J. Holah (Eds.), *Handbook of hygiene control in the food industry*. (2nd ed). (pp.641-663). Cambridge: Woodhead Publishing Limited.

McDonnell, G., Russell, A. D. (1999). Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 12 (1), 147-179

Okhiria, O. A. (2010). *The role of biofilm in wounds*. PhD thesis. Cardiff: University of Wales Institute.

Pal, C., Johan Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., Larsson, J. (2015) Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. *BMC Genomics*. 16, 2-14

Paula, G. F., Neto, G. I., Mattoso, L. H. C. (2011). Physical and Chemical Characterization of Poly (hexamethylene biguanide) Hydrochloride. *Polymers*. 3, 928-941

Pereira, M. O. B. O. (2001). Comparação da eficácia de dois biocidas (carbamato e glutaraldeído) em sistemas de biofilme. Dissertação para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia Química e Biológica. Minho: Universidade do Minho

Progent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C., Lejeune, P. (1999). Abiotic Surface Sensing and Biofilm-Dependent Regulation of Gene Expression in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 181 (19), 5993–6002

Poole, K. (2002). Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*. 92, 55–64

Putman M., Van Veen, H. W., Konings, W. N. (2000). Molecular Properties of Bacterial Multidrug Transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64. 672–693

Regulamento (EU) Nº 440/2008 da Comissão das Comunidades Europeias de 30 de Maio de 2008. Jornal Oficial da União Europeia. Nº L 142/1 de 31.5.2008

Regulamento (EU) Nº 528/2012 do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de Maio de 2012. Jornal Oficial da União Europeia. Nº L 167/1 de 27.6.2012

Rossmore, H. W. (1995). Introduction to Biocide Use. In H.W. Rossmore (Ed). *Handbook of Biocide and Preservative Use*. (pp.1-18). Glasgow, UK: Blackie Academic and Professional

- Russell, A. D., Tattawasart, Maillard, J. Y., Furr, J. R. (1998). Possible Link between Bacterial Resistance and Use of Antibiotics and Biocides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 42 (8), 2151
- Russel, A. D. (2002). Antibiotic and biocide resistance in bacteria: Introduction. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*. 92, 1-3.
- Russel, A. D., McDonnell, G. (2000). Concentration: a major factor in studying biocidal action. *Journal of Hospital Infection*. 44 (1), 1-3.
- Rutala, W. A, Weber, D. J., Weinstein, R. A., Siegel, J. D, Pearson, M. L., Chinn, R. Y. W., DeMaria, A. M., Lee, J. T., Scheckler, W. E., Stover, B. H., Underwood, M. A. (2008). *Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities*. (pp. 33-35). Atlanta: CDC
- Rutala, W. A., Weber, D. J. (2013). Disinfectants used for environmental disinfection and new room decontamination technology. *American Journal of Infection Control*. 41 (5), 36-41
- Sanchez-Vizuite, P., Orgaz, B., Aymerich, S., Le Coq, D., Briandet, R. (2015). Pathogens protection against the action of disinfectants in multispecies biofilms. *Frontiers in Microbiology*. 6, 1-12
- Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (2009). *Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides*. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. Brussels: EC
- Sepandj, F., Ceri, H., Gibb, A., Read, R., Olson, M. (2004). Minimum inhibitory concentration (MIC) versus minimum biofilm eliminating concentration (MBEC) in evaluation of antibiotic sensitivity of gram-negative bacilli causing peritonitis. *Peritoneal Dialysis International*. 24, 65-77
- Seth, A. K, Geringer, M. R., Hong, S. J., Leung, K. P, Galiano, R. D., Mustoe, T. A. Comparative Analysis of Single-Species and Polybacterial Wound Biofilms Using a Quantitative, In Vivo, Rabbit Ear Model. *Plos One*. 7 (8), 1-9
- Sifri, C. D. (2008). *Quorum Sensing: Bacteria talk sense*. *Healthcare Epidemiology*. 47 (8): 1070-1076

Silva, P. E. A., Palomino, J. C. (2011). Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 66, 1417 –1430

Simões, M., Simões, L., Vieira, M. J. (2010)^a. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*. 43, 573–583

Simões, L. C., Simões, M., Vieira, M. J. (2010)^b. Influence of the Diversity of Bacterial Isolates from Drinking Water on Resistance of Biofilms to Disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*. 76 (19), 6673–6679

Simões, M., Simões, L., Machado I., Pereira, M. O., Vieira, M. J. (2006). Control of flow generated biofilms with surfactants-Evidence of Resistance and Recovery. *Food and Bioproducts Processing*. 84, 338– 345

Spinosa, H. S. (2011)^a. Antibióticos que interferem na síntese da parede celular: beta-lactâmicos. In H.S. Spinosa, S.L. Górniak, M.M. Bernardi, *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*, (5^a ed). Rio de Janeiro: Gunabara Koogan

Spinosa, H. S. (2011)^b. Antibióticos que interferem na síntese da parede celular (bacitracina, glicopeptídios e fosfomicina) e na Permeabilidade da membrana celular (polimixinas). In H.S. Spinosa, S.L. Górniak, M.M. Bernardi, *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*, (5^a ed). Rio de Janeiro: Gunabara Koogan

Spoering, A. L., Lewis, K. (2001). Biofilms and Planktonic Cells of *Pseudomonas aeruginosa* Have Similar Resistance to Killing by Antimicrobials. *Journal of Bacteriology*. 183 (23), 6746–6751

Sriwilaijaroen, N., Wilairat, P., Hiramatsu, H., Takahashi, T., Suzuki, T., Ito, M., Ito, Y., Tashiro, M., Suzuk, Y.(2009). Mechanisms of the action of povidone-iodine against human and avian influenza A viruses: its effects on hemagglutination and sialidase activities. *Virology Journal*, 6, Article 124. Acedido em Abr, 24, 2016, disponível em <http://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-6-124>

To, M. S., Favrin, S., Romanova, N., Griffiths, M. W. (2002). Postadaptational Resistance to Benzalkonium Chloride and Subsequent Physicochemical Modifications of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(11), 5258–5264

Trejo-Hernández, A., Andrade-Domínguez, A., Hernández, M., Encarnación, S. (2014). Interspecies competition triggers virulence and mutability in *Candida albicans*–*Pseudomonas aeruginosa* mixed biofilms. *International Society for Microbial Ecology*. 8(10):1974-88

Varposhti, M., Entezari, F., Feizabadi, M. M. (2014). Synergistic interactions in mixed-species biofilms of pathogenic bacteria from the respiratory tract. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 47 (5), 649-652

Vasudevan, R. (2014). Biofilms: Microbial Cities of Scientific Significance. *Journal of Microbiology & Experimentation*. 1, Article 00014. Acedido em Mai.19, 2016. Disponível em <http://medcraveonline.com/JMEN/JMEN-01-00014.pdf>

Yang, L., Liu, Y., Wu, H., Høiby, N., Molin, S., Song, Z. (2011). Current understanding of multi-species biofilms. *International Journal of Oral Science*. 3, 74-81

Webber, M. A., Piddock, L. J. V. (2003). The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 51, 9-11

Wilson, M. (2001). Bacterial biofilms and human disease. *Science Progress*. 84, 235–254

Zorko, M., Jerala, R. (2008). Alexidine and chlorhexidine bind to lipopolysaccharide and lipoteichoic acid and prevent cell activation by antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 62, 730– 737

Anexos

Anexo I- Protocolo no qual se baseou o presente estudo de eficácia do biocida cloreto de benzalcônio em biofilmes



Designation: E2871 – 12

Standard Test Method for Evaluating Disinfectant Efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Grown in CDC Biofilm Reactor using Single Tube Method¹

This standard is issued under the fixed designation E2871; the number immediately following the designation indicates the year of original adoption or, in the case of revision, the year of last revision. A number in parentheses indicates the year of last reapproval. A superscript epsilon (ε) indicates an editorial change since the last revision or reapproval.

1. Scope

1.1 This test method specifies the operational parameters required to perform a quantitative liquid disinfectant efficacy test against biofilm bacteria.

1.2 The test method was developed using a *Pseudomonas aeruginosa* biofilm grown in the CDC Biofilm Reactor (Test Method E2562), modified to include borosilicate glass coupons as a hard nonporous surface and *P. aeruginosa* ATCC 15442.

1.3 Disinfectant preparation and contact time are used in the assessment according to the manufacturer's instructions for use.

1.4 The test method uses a closed system to treat biofilm. A coupon is placed in a single tube for the treatment, neutralization, and sampling steps to prevent the loss of cells.

1.5 Verification of disinfectant neutralization is determined prior to conducting the test method.

1.6 This test method describes how to sample and analyze treated and untreated control biofilms for viable cells. Biofilm population density is recorded as log₁₀ colony-forming units per coupon. Efficacy is reported as a log₁₀ reduction of viable cells.

1.7 Basic microbiology training is required to perform this assay.

1.8 The values stated in SI units are to be regarded as standard. No other units of measurement are included in this standard.

1.9 *This standard does not purport to address all of the safety concerns, if any, associated with its use. It is the responsibility of the user of this standard to establish appropriate safety and health practices and determine the applicability of regulatory limitations prior to use.*

2. Referenced Documents

2.1 ASTM Standards:²

E1054 Test Methods for Evaluation of Inactivators of Antimicrobial Agents

E2562 Test Method for Quantification of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Grown with High Shear and Continuous Flow using CDC Biofilm Reactor

2.2 Other Standards:

Method 9050 C.1.a Buffered Dilution Water Preparation according to Eaton et al (1)³

3. Terminology

3.1 Definitions:

3.1.1 *biofilm, n*—microorganisms living in a self-organized community attached to surfaces, interfaces, or each other, embedded in a matrix of extracellular polymeric substances of microbial origin, while exhibiting altered phenotypes with respect to growth rate and gene transcription.

3.1.1.1 *Discussion*—Biofilm may be comprised of bacteria, fungi, algae, protozoa, viruses, or infinite combinations of these microorganisms. The qualitative characteristics of a biofilm including, but not limited to, population density, taxonomic diversity, thickness, chemical gradients, chemical composition, consistency, and other materials in the matrix that are not produced by the biofilm microorganisms, are controlled by the physicochemical environment in which it exists.

3.1.2 *contact time, n*—predetermined time that the biofilm is exposed to the activity of a disinfectant.

3.1.3 *coupon, n*—biofilm growth surface.

3.1.4 *disinfectant, n*—a chemical that destroys vegetative forms of microorganisms, but does not ordinarily kill bacterial spores.

3.2 Acronyms:

¹ This test method is under the jurisdiction of ASTM Committee E35 on Pesticides, Antimicrobials, and Alternative Control Agents and is the direct responsibility of Subcommittee E35.15 on Antimicrobial Agents.

Current edition approved April 1, 2012. Published June 2012. DOI: 10.1520/E2871-12.

² For referenced ASTM standards, visit the ASTM website, www.astm.org, or contact ASTM Customer Service at service@astm.org. For *Annual Book of ASTM Standards* volume information, refer to the standard's Document Summary page on the ASTM website.

³ The boldface numbers in parentheses refer to a list of references at the end of this standard.

- 3.2.1 *ATCC*—American Type Culture Collection.
- 3.2.2 *CDC*—Centers for Disease Control and Prevention.
- 3.2.3 *CFU*—colony-forming unit.

4. Summary of Test Method

4.1 This test method describes the use of the single tube method to evaluate the efficacy of a liquid disinfectant against a *Pseudomonas aeruginosa* biofilm on a hard nonporous surface grown in the CDC Biofilm Reactor. The test method consists of adding a disinfectant (treated) or a control buffer (untreated) to individual coupons held in 50-mL conical tubes. Three coupons are treated with disinfectant and three coupons receive buffered dilution water. Neutralizer is added to the tubes after the appropriate contact time. A combination of vortexing and sonication are used to remove the biofilm from the coupon and disaggregate the clumps. The cell suspension is serially diluted and plated on agar medium. Viable plate counts from treated and untreated control coupons are used to calculate the \log_{10} reduction of viable cells.

5. Significance and Use

5.1 Vegetative biofilm bacteria are phenotypically different from suspended planktonic cells of the same genotype. Biofilm growth reactors are engineered to produce biofilms with specific characteristics (2). Altering either the engineered system or operating conditions will modify those characteristics as well as the physicochemical environment. The goal in biofilm research and efficacy testing is to choose the growth reactor and operating conditions that generate the most relevant biofilm for the particular study.

5.2 The test method was developed using *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 biofilm grown on borosilicate glass coupons in the CDC Biofilm Reactor and liquid disinfectants. Efficacy data developed using other bacteria, different shear, different coupons, or other standardized biofilm reactor systems, and/or other forms of disinfectants may result in different \log_{10} reduction (LR) values and repeatability and reproducibility standard deviations.

5.3 The efficacy test was designed to determine the \log_{10} reduction in bacteria after exposure to a disinfectant in a closed system.

5.4 The test method was developed using 50-mL conical tubes. The conical geometry allows for disinfectant exposure to biofilm on all surfaces of the coupon.

5.5 Each efficacy test includes a single contact time and temperature for three untreated control coupons (exposed to buffered dilution water) and three treated coupons (per disinfectant/concentration combination).

6. Apparatus

- 6.1 *Conical centrifuge tubes*, sterile, any with 50-mL volume capacity and secure leakproof lids.
- 6.2 *Ultrasonic water bath*, any capable of maintaining a homogeneous sound distribution at 45 kHz with a variable power setting and a volume large enough to accommodate 50-mL conical tubes in a wet environment.

6.3 *Test tube rack*, any capable of holding 50-mL conical centrifuge tubes.

6.4 *Micropipettes*, continuously adjustable pipettes with volume capacity of 100 μ L and 1000 μ L.

6.5 *Sterile pipette tips*, 100- μ L and 1000- μ L volumes.

6.6 *Bunsen burner*, used to flame-sterilize Allen wrench and plate spreader.

6.7 *95 % Ethanol*, used to flame-sterilize Allen wrench and plate spreader.

6.8 *Small Allen wrench*, for loosening set screws and pushing coupons out of reactor rods.

6.9 *Timer*, any that can display time in seconds.

6.10 *Vortex mixer*, any vortex that will ensure proper agitation and mixing of centrifuge tubes.

6.11 *Serological pipettes*, sterile single-use pipettes with volume capacity of 1, 5, 10, 25, and 50 mL.

6.12 *Plate spreader*, for spreading serial dilutions on agar plates.

6.13 *Water bath*, any capable of maintaining a constant temperature of $20 \pm 1^\circ\text{C}$.

6.14 *Sterilizer*, any steam sterilizer capable of producing the conditions of sterilization.

6.15 *Colony counter*, any one of several types may be used. A hand tally for recording of the bacterial count is recommended if manual counting is done.

6.16 *Environmental incubator*, any capable of maintaining a temperature of $36 \pm 2^\circ\text{C}$.

6.17 *Appropriate glassware/plasticware*, as required to make media and agar plates.

6.18 *Volumetric flasks*, used for preparing disinfectants.

6.19 *Magnetic stir bars*, sterile, for mixing prepared disinfectant.

6.20 *Magnetic stir plate*, any capable of mixing.

7. Reagents and Materials

7.1 *Purity of Water*—all references to water as diluent or reagent shall mean distilled water or water of equal purity.

7.2 *Bacterial Plating Medium*—R2A agar is recommended.

7.3 *Buffered Water*—0.0425 g KH_2PO_4 /L distilled water, filter-sterilized and 0.405 g $\text{MgCl}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ /L distilled water; filter-sterilized (prepared according to Method 9050 C.1.a Buffered Dilution Water Preparation (1)).

7.4 *Disinfectant*—product to be tested.

7.5 *Neutralizer*—Dey/Engley Neutralization Broth or one specific to the disinfectant being evaluated as determined for effectiveness and toxicity according to Test Method E1054.

8. Culture/Inoculum Preparation

8.1 Borosilicate glass coupons with mature *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 biofilm grown according to Test Method E2562 through step 10.2.4.

9. Procedure

9.1 The test is conducted with three treated and three untreated control coupons.

9.2 An overview of the procedure is shown in Fig. 1.

9.3 Prepare Disinfectant:

9.3.1 Prepare disinfectant according to manufacturer's specifications in sterile volumetric glassware. Ensure that the disinfectant is adequately mixed. Use within 3 h of preparation or as specified in the manufacturer's instructions.

9.3.2 Place prepared disinfectant in water bath equilibrated to $20 \pm 1^\circ\text{C}$ for 10 to 15 min.

9.4 Remove Coupons from the CDC Biofilm Reactor:

9.4.1 Prepare sampling materials: treatment tubes, rinse tubes, small flame-sterilized Allen wrench, and serological pipettes.

9.4.2 Aseptically remove a randomly selected rod containing coupons with biofilm from the CDC Biofilm Reactor by pulling it straight up firmly.

9.4.3 Rinse the coupons to remove planktonic cells. Orient the rod in a vertical position directly over a 50-mL conical centrifuge tube that contains 30-mL sterile buffered water. Immerse the rod with a continuous motion into the buffered water with minimal to no splashing, then immediately remove. A new 50-mL conical tube containing 30-mL sterile buffered water is used for each rod.

9.4.4 Hold the rod with one of the randomly selected coupons centered over an empty, sterile 50-mL conical tube. Loosen the set screw and allow the coupon to drop directly to the bottom of the tube. If the coupon does not freely drop, press directly in the center of the coupon with the Allen wrench used to loosen the set screw.

NOTE 1—The use of 50-mL conical tubes allows for uniform disinfectant contact around the entire coupon surface.

9.4.5 Repeat coupon removal twice more for a total of three tubes each containing a coupon.

NOTE 2—All biofilm on the coupon must be exposed to disinfectant. Do not lose any biofilm from the coupon by allowing it to touch the top or the inner sides of the 50-mL conical tube as it falls to the bottom of the tube. To ensure that the maximum biofilm surface area is in contact with the disinfectant, the coupon should be at an angle in the bottom of the tube. Discard any tubes where the coupon touched the inner side of the tube and/or held coupons that were not angled and replace them with new tubes and coupons.

9.5 Conduct Efficacy Evaluation:

9.5.1 Slowly pipette 4 mL previously prepared and equilibrated disinfectant (treatment) or equilibrated buffered dilution water (untreated control) into the tubes containing the coupons, being careful to completely cover the coupon. Note and record the time.

NOTE 3—The order of application of disinfectant or buffered dilution water is randomly selected.

NOTE 4—For a 10-min contact time, a 1-min interval between coupons is recommended.

9.5.2 Tap each tube to release any air bubbles trapped below the coupon. Do not shake the tubes.

9.5.3 Incubate the tubes at $20 \pm 1^\circ\text{C}$ for the specified contact time.

9.5.4 At the end of the contact time, add appropriate volume of neutralizer to each tube. Replace the cap and mix thoroughly by vigorously shaking the tube several times. Allow the coupon to remain in the neutralized disinfectant at room temperature until step 9.6.

NOTE 5—It is recommended that a neutralization study be conducted prior to running the efficacy test (Test Method E1054) to determine the appropriate neutralizer formulation, concentration, volume, and neutralization time. For each efficacy test, the concentration, volume, and neutralization time should be the same for the control and treated coupons. Thirty-six (36) mL of neutralizer was used in the collaborative study.

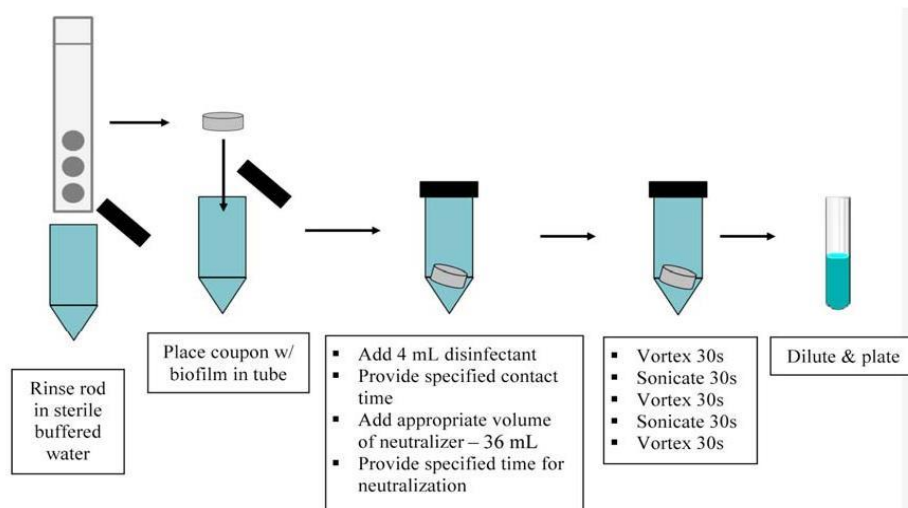


FIG. 1 Single Tube Method Overview

9.5.5 Obtain a set of three coupons for the remaining treatment(s) or control(s) as described in steps 9.4.2 through 9.4.5.

9.5.6 Repeat steps 9.5.1 through 9.5.4 with randomly selected treatment(s) or control(s).

9.6 Remove and Disaggregate Biofilm:

9.6.1 Vortex each tube on the highest setting for 30 ± 5 s.

9.6.2 Place all tubes into a test tube rack and suspend the rack in the ultrasonic water bath so that the liquid level in the tubes is even with the water level in the tank of the bath.

9.6.3 Sonicate the tubes at 45 kHz for 30 ± 5 s.

9.6.4 Vortex the tubes as described in 9.6.1.

9.6.5 Sonicate the tubes as described in 9.6.2 and 9.6.3.

9.6.6 Vortex the tubes as described in 9.6.1. These tubes are the 10^0 dilution.

9.7 Dilute and Plate Disaggregated Biofilm Samples:

9.7.1 Serially dilute the sample in buffered water.

9.7.2 Culture each dilution in duplicate for colony growth using an accepted plating technique such as spread- or pour-plating.

9.7.3 Incubate plates at $36 \pm 2^\circ\text{C}$ for 24 to 28 h.

9.7.4 Count the appropriate number of colonies according to the plating method used.

10. Data Analysis

10.1 Calculate biofilm density.

10.1.1 Calculate X , the arithmetic mean CFU from the replicate samples plated (3).

10.1.2 The \log_{10} density for each coupon is calculated as follows:

$$\log_{10}(\text{CFU/coupon}) = \log_{10}[(X/B)(V/D)] \quad (1)$$

where:

X = average CFU of the replicate sample plates,

B = volume plated,

V = volume of disinfectant or buffered water plus neutralizer,

D = 10^{-k} , and

k = dilution.

10.2 Calculate the mean \log_{10} density for each set of treated and control coupons as follows:

$$\text{Mean LD} = [\log_{10}(\text{Coupon A}) + \log_{10}(\text{Coupon B}) + \log_{10}(\text{Coupon C})]/3 \quad (2)$$

10.3 Calculate the \log_{10} reduction for each disinfectant as follows (4):

$$\text{LR} = \text{Mean } \log_{10} \text{ Untreated Coupons} - \text{Mean } \log_{10} \text{ Treated Coupons} \quad (3)$$

10.4 Calculate the standard error of the mean LR as follows:

$$\text{SE of mean LR} = \frac{\text{SD}}{\sqrt{m}} \quad (4)$$

where:

SD = standard deviation of the LR, and

m = number of experiments performed in a single laboratory.

10.5 Calculate the percent kill as follows:

$$\% \text{ Kill} = (1 - 10^{-\text{LR}}) \times 100 \quad (5)$$

11. Precision and Bias

11.1 Randomization is used whenever possible to reduce the potential for systematic bias.

11.2 Several potential biases exist for this method.

11.2.1 A bias may occur between treated and control coupons due to increased fixation or wash-off effects of particular disinfectants. Untreated control coupons receive buffered dilution water only and are, therefore, not exposed to the inactive ingredients found in disinfectants. These inactive ingredients may enhance removal of surface-associated bacteria due to surfactant properties or inhibit removal due to increased pH.

11.2.2 For treated coupons, some disinfectants cause oxidative injury to cell membranes. Cells that have compromised membranes may be completely killed by sonication (5). Untreated control coupons are exposed to buffered dilution water only. Since the surface-associated bacteria are removed from the coupons with vortexing and sonication, it is not possible to determine if ultrasonic waves exhibit an efficacy of their own without performing bias checks prior to the efficacy testing using planktonic cultures.

11.2.3 Bias checks can be performed by viewing coupon surfaces microscopically for biofilm removal. Cell suspensions can be filtered onto membranes, stained and examined microscopically for clumps of cells.

11.3 Two statements concerning the precision of this method can be made, one for the untreated controls, and one for the \log_{10} reductions.

11.3.1 The controls for this test method were verified with *P. aeruginosa* ATCC 15442 biofilm grown on borosilicate glass coupons in the CDC Biofilm Reactor. Two labs ran a total of 20 experiments (11 experiments at one lab, and 9 at the other), with triplicate coupons in each experiment. The mean LD was equal to 9.06 CFU/coupon. The repeatability standard deviation for the mean LD of the three control coupons was 0.1461, and the reproducibility standard deviation was 0.2034. The sources of variability were: 4 % attributable to within-experiment sources, 48 % attributable to among-experiment sources, and 48 % attributable to among-lab sources.

11.3.2 The LR values for this test method were verified with *P. aeruginosa* ATCC 15442 biofilm grown on borosilicate glass coupons in the CDC Biofilm Reactor. Three EPA-registered disinfectants were used (sodium hypochlorite-, alcohol-, and hydrogen peroxide-based products) at a high and low concentration with three repeated experiments per disinfectant in each of two laboratories, with triplicate coupons used in each experiment. Thus, six experiments were performed for each of the six combinations of disinfectant and concentration. The repeatability standard deviations for the mean LR values, based on the mean of three control coupons and three treated coupons, ranged from 0.06 to 0.15 for disinfectants with mean \log_{10} reductions less than 2, and ranged from 0.56 to 1.1 for disinfectants with mean \log_{10} reductions greater than 2. The reproducibility standard deviations for the mean LR values ranged from 0.07 to 0.33 for disinfectants with mean \log_{10}

reductions less than 2, and ranged from 0.57 to 1.1 for disinfectants with mean log₁₀ reductions greater than 2.

12. Keywords

12.1 antimicrobial; biofilm; CDC Biofilm Reactor; disinfectant; efficacy testing; log reduction; *Pseudomonas aeruginosa*; sampling

REFERENCES

- (1) Eaton, A. D., Clesceri, L. S., Rice, E. W., Greenberg, A. E., Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water, 21st Edition, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Washington D.C., 2005.
- (2) Buckingham-Meyer, K., Goeres, D. M., Hamilton, M. A., "Comparative evaluation of biofilm disinfectant efficacy tests," *Journal of Microbiological Methods*, Vol 70, 2007, pp. 236–244.
- (3) Hamilton, M. A., Parker, A. E., 2010. Testing surface disinfectants: Enumerating viable cells by pooling counts for several dilutions. Center for Biofilm Engineering, KSA-SM-06 available at http://www.biofilm.montana.edu/resources/knowledge_sharing_articles.
- (4) Hamilton, M. A., Parker, A. E., 2010. Testing surface disinfectants: The log reduction (LR) measure of disinfectant efficacy. Center for Biofilm Engineering, KSA-SM-07 available at http://www.biofilm.montana.edu/resources/knowledge_sharing_articles.
- (5) Madge, B. A., Jensen, J. N., "Disinfection of wastewater using a 20-kHz ultrasound unit," *Water Environment Research*, Vol 74, No. 2, 2002, pp. 159–169.

ASTM International takes no position respecting the validity of any patent rights asserted in connection with any item mentioned in this standard. Users of this standard are expressly advised that determination of the validity of any such patent rights, and the risk of infringement of such rights, are entirely their own responsibility.

This standard is subject to revision at any time by the responsible technical committee and must be reviewed every five years and if not revised, either reapproved or withdrawn. Your comments are invited either for revision of this standard or for additional standards and should be addressed to ASTM International Headquarters. Your comments will receive careful consideration at a meeting of the responsible technical committee, which you may attend. If you feel that your comments have not received a fair hearing you should make your views known to the ASTM Committee on Standards, at the address shown below.

This standard is copyrighted by ASTM International, 100 Barr Harbor Drive, PO Box C700, West Conshohocken, PA 19428-2959, United States. Individual reprints (single or multiple copies) of this standard may be obtained by contacting ASTM at the above address or at 610-832-9585 (phone), 610-832-9555 (fax), or service@astm.org (e-mail); or through the ASTM website (www.astm.org). Permission rights to photocopy the standard may also be secured from the ASTM website (www.astm.org/COPYRIGHT/).